25040

National Research Council Canada
Conseil national de recherches Canada

BIOTECHNOLOGICAL SAFETY

OCTOBER 1984

BIOTECHNOLOGICAL SAFETY

Report presented to the

National Research Council of Canada

Jean-Claud Panisset, DMV, PhD
Principal Investigator
Professor
Département de médecine du travail
et d'hygiène du milieu
Université de Montréal

Alexandre Sasarman, MD, D Sc
Professor
Département de microbiologie
et d'immunologie
Faculté de médecine
Université de Montréal

F Pierre Dussault, PhD
Consultant Biochemist
Occupational Health and Safety
3431, av Laval
Montréal H2X 3C7

Gérard Ozanne, PhD
Assistant Professor
Département de microbiologie
et d'immunologie
Faculté de médecine
Université de Montréal

Marie L'Ecuyer, B Pharm, L Pharm
Editor
5576, rue Plantagenet
Montréal H3T 1S2

October 1984

TABLE OF CONTENTS

	Page
INTRODUCTION	1
Chapter I	
1.0 Hazards in the workplace	5
1.1 Use of microorganisms	5
1.1.1 Use of large populations of microorganisms	5
1.1.2 Use of altered microorganisms	6
1.1.3 Use of pathogenic microorganisms	7
1.2 Biological procedures and the chemical industry	9
1.3 Products and byproducts of biotechnologies	10
1.3.1 Products of fermentation	10
1.3.2 Byproducts of fermentation	11
1.4 Cell cultures	13
Chapter II	
2.0 Hazards to the environment	15
2.1 Industrial wastes and byproducts	15
2.1.1 Microorganisms	15
2.1.2 Antibiotics	18
2.1.3 Chemical products and organic byproducts	19
2.2 Living microorganisms used as agents in processes occurring in the open	20
2.2.1 Microbiological depollution: detoxication of industrial wastes and treatment of waste water	21
2.2.2 Leaching of metals	23
2.2.3 Agriculture	25
2.2.4 Parasite control	26

Chapter III

3.0 Avenues of research 28

3.1 Workplace 28

3.1.1 Use of microorganisms 28

3.1.2 Products and byproducts of fermentation 29

3.1.3 Cell cultures 30

3.2 Environment 30

3.2.1 Industrial wastes and byproducts of biotechnologies 30

3.2.2 Detoxication of industrial wastes and treatment of waste water 32

3.2.3 Leaching of metals 33

3.2.4 Agriculture 33

3.2.5 Parasite control 33

3.2.6 Priorities 34

Chapter IV

4.0 Guidelines and regulations 36

4.1 Canada 36

4.2 United States 39

4.3 Great Britain 42

4.4 France 42

Chapter V

5.0 Fears of a sociopolitical nature 44

CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS 46

APPENDIX 49

LIST OF SOURCES CONSULTED 50

INTRODUCTION

As a result of the spectacular progress achieved in the field of genetic engineering over the past decade, biotechnology is currently experiencing enormous growth. In fact, genetic engineering will mean a substantial increase in possible new uses for biological functions in the production of goods and services. But while biotechnology is a source of great hope today, it also arouses serious fears. On the one hand, it offers hope of new sources of energy, increased food production, cures for hereditary diseases and the elimination of cancer; on the other, it raises the spectre of new diseases, devastating microbial pollution and "reprogrammed" human beings. It should be pointed out at once that the latter danger is far from imminent, given current scientific knowledge; moreover, it goes beyond the scope of the present study. With this exception, the fears suggested correspond to real hazards which must be analysed if they are to be minimized.

It was for the express purpose of assessing these hazards and of drafting a set of rules to ensure the safety of experiments in genetic engineering that a group of scientists met at Asilomar in 1975. The following year, the US National Institute of Health (NIH) published a first series of guidelines. In 1978, the Medical Research Council of Canada (MRC) published its own safety regulations, dealing not only with recombinant DNA but with virus and cell cultures as well. Great Britain has incorporated its safety rules into its occupational health and safety legislation. It should be pointed out that the chemical industry and the pharmaceutical industry have had to adopt safety rules, like any industry which poses a risk to the environment, and those which make use of biological techniques are no exception.

At the present time, the safety rules designed to eliminate risks of infection in the laboratory would appear to be adequate: there are good aseptic techniques for the handling of microorganisms, decontamination methods for laboratory materials, devices to sterilise the air in working zones where the risk of contamination is high. At the same time, the safety guidelines are still very sketchy as regards the utilisation and release into the environment of massive quantities of microorganisms. There are a number of gaps to be dealt with, then, in the area of safety, because the hazards associated with industrial biological procedures are not adequately defined. It is in this context that we have submitted this proposal to the National Research Council of Canada for a study regarding the safety of industrial biological procedures involving large quantities of microorganisms or somatic cells. This study is designed to meet the following objectives:

1. To identify and assess the hazards associated with biotechnology for man and the environment.

2. To examine the guidelines applied to advanced biological techniques and to identify the orientation of current research in this area.

3. To analyse the fears of a sociopolitical nature aroused by the development of biotechnology.

4. To direct the Institute of Biotechnology in its research and development policies by defining the type of research which is required and the principal avenues to be explored.

The hazards associated with biotechnology occur on two principal levels:

1. First, in the workplace, where microorganisms and cells are manipulated within containment limits - fermenters - to produce hormones, drugs, solvents and organic acids;

2. Second, in the environment, into which the waste products of fermentations performed under closed conditions (fermenters) are discharged and into which, as well, microorganisms are deliberately introduced for various purposes, including leaching of metals, fertilization of the soil, elimination of harmful insects, treatment of waste products and waste water or even extraction of oil.

The first two chapters deal with these two questions. The first chapter discusses the problems which arise from the use of microorganisms and somatic cells in the workplace, the hazards associated with the procedures and the handling of products of fermentation. Each case is followed by an assessment of these hazards and suggestions on safety measures to be observed and avenues of research to be explored.

The second chapter deals with the risks of biotechnology to the environment. It examines the questions of industrial waste and byproducts of fermentation released into the environment, and goes on to deal with the question of the use of microorganisms as biological agents in various processes occurring in the open: possible applications in this field (depollution, agriculture, etc) and related problems. As in the

preceding chapter, each case includes a description of the characteristics of the situation and of the resulting hazards, an assessment of these hazards and proposals with respect to safety measures and possible avenues of research.

In the third chapter, the authors summarise, in list form, all the avenues of research proposed in chapters I and II, and identify certain fields of research which they feel require priority attention.

In the fourth chapter, the authors examine the safety rules in effect in Canada, the United States, Great Britain and France, identify the agencies involved in the development of these guidelines and outline current trends in the field of biotechnological safety.

The fifth chaper deals with the question of the sociopolitical fears aroused by biotechnology.

Finally, the authors offer a number of proposals designed to direct the Institute of Biotechnology in its research and development policies with respect to safety.

Chapter I

1.0 Hazards in the workplace

The industrial procedure of fermentation includes a series of stages - preparation of the substrate, fermentation proper, extraction and purification - each involving a certain number of hazards which can be grouped in three categories:

- hazards associated with the use of microorganisms;
- hazards associated with the procedures;
- hazards associated with the products.

1.1 Use of microorganisms

1.1.1 Use of large populations of microorganisms

During the fermentation and extraction stages, dense aerosols of microorganisms may be produced outside the fermenters. At the present time, industry has fermenters capable of holding enormous volumes of culture and if industry continues to rely increasingly on procedures involving very large quantities of microorganisms (fermenters with capacities of 30,000 to 150,000 L of culture), it will be practically impossible to eliminate leakage from these fermenters, (Bull, Alan T et al. Biotechnologie: Tendances et perspectives internationales. OECD 1982).

Since leakage of microorganisms will be almost inevitable, the as yet unknown nature of the hazard will depend on the characteristics of the microorganisms used.

In addition to leakage, we must also consider the risk of mutation and that of contamination of the cultures by other types of microorganisms, leading to the possible development of contaminating microbial populations of an unknown nature.

1.1.2 Use of altered microorganisms

In the light of these observations, it is quite possible that new genetically-engineered microorganisms will multiply outside the zones of physical containment. The microorganisms could then contaminate the workplace, producing, for example:

1. new infections;
2. colonization of the workers and transmission of new properties to the bacterial flora of the workers. These might include resistance to antibiotics (Newman, 1984), cellulolytic properties and the ability to synthesize proteins similar to those of man, a situation which could contribute to the development of autoimmune diseases (Newman, 1982).

The microorganisms normally used in biotechnology have never yet caused serious infections in those handling them (Landrigan, 1982). Current indications are that the hazards associated with the use of new microorganisms will, in all probability, be slight (Landrigan, 1982). In fact, these recombined organisms

are extremely fragile and reproduction is unlikely outside their specific culture medium. However, the development and use of more resistant microorganisms in order to maximize production will improve their chances of survival outside the zones of containment in the workplace. Consequently, the risks of infection will increase as well.

1.1.3 Use of pathogenic microorganisms

We should point out, first of all, that the microorganisms normally used in biotechnology are, for the most part, non-pathogenic (Russell, 1983). However, some of them, including Pseudomonas, are what are known as opportunistic microorganisms and could thus represent a risk of infection in the workplace. Use of the true pathogens has been limited to date to the production of vaccines, which is carried out in accordance with effective methods of containment. The handling of pathogenic organisms is thus nothing new; the problem is to adapt known aseptic techniques in this field to the fermentation of very large populations of microorganisms.

One risk, however, does remain: that of contamination by altered bacteria with unknown pathogenic or toxigenic properties. In fact, it is possible that researchers could, in the course of genetic manipulations, accidentally produce microorganisms analogous, for example to the diphtheria bacillus

or the cholera vibrio, or microorganisms bearing carcinogenic DNA (Newman, 1982).

While we are aware of the risk of infection, it is important to note that humanity has learned to combat this risk effectively. In fact, man's struggle against epidemics goes back to Antiquity and, since Pasteur's revolutionary discoveries, has been based on solid scientific foundations. Research into infectious diseases, which has led to the improvement of aseptic techniques, the discovery and use of vaccines and antibiotics, has brought great victories, notably the eradication of smallpox. We can thus continue to count on the support of research in dealing with any risks of infection which may be created by biotechnology.

Furthermore, it should be pointed out that safety rules have already been developed to protect workers in the biological industries and that these rules are frequently reviewed and updated to improve biotechnological safety. For example, we have measures designed to ensure physical and biological containment. In the first case, this means primary containment measures, relating to the equipment containing the microorganisms or cells (the containment enclosures and fermenters); for example:

- inside the fermenter, maintenance of pressure on the culture medium at a level which will assist in preventing leaks from the equipment (RECD, 1983);

- the use of antiseptic solutions in the joints of the containment equipment, sterile barriers on line openings (Russell, 1983).

- sterilization of air leaving the containment equipment (Russell, 1983).

Secondary containment measures relate to the immediate environment of the containment enclosures and fermenters. For example, they include the maintenance of negative pressure and air filtration between the immediate environment of this equipment and the rest of the facilities (Russell, 1983).

Biological containment, which consists of using genetic recombination to produce microorganisms with low survival value outside their specific culture medium, also makes it possible to improve the safety of biological procedures (Landrigan, 1982).

Biological containment can be achieved by altering microorganisms so that, for example, they are capable of degrading only a particular type of substrate or so that they can survive only within a very narrow temperature range (Miller, 1984).

1.2 Biological procedures and the chemical industry

The hazards associated with the use of living microorganisms are the most serious encountered in conjunction with biological procedures and, in addition, are specific to these procedures. Thus they require particular attention. The following, then,

is a brief review of the hazards common to biotechnology and the chemical industry. These hazards arise from the preparation of substrates (on which the microorganisms will grow) and from the extraction and purification stages (used to isolate the product) (Russell, 1983). Depending upon the stages of production, the procedures involve various operations, including distillation or extraction by solvent, and require the use of solvents (phenol, benzene, chloroform, toluene), buffers (sodium hydroxide, urea) and antibiotics (ampicillin, chloramphenicol, tetracycline) (Landrigan, 1982). The use of antibiotics in fermentations constitutes a hazard which already exists in the pharmaceutical industry and the agrifood industry and which consists primarily of hypersensitive reactions and the development of resistance to antibiotics. Generally well defined safety measures have been developed to deal with the hazards associated with these operations because they already exist in the chemical industry. It is important to add that biological procedures require less dangerous operating conditions than the procedures used by the chemical industry. The former are performed in very dilute solution, at moderate pH and temperatures close to ambient temperature, while the latter normally require the use of caustic or flammable substances, high temperatures and pressures and also involve the danger of explosions or strong exothermic reactions (Russell, 1983).

1.3 Products and byproducts of biotechnologies

1.3.1 Products of fermentation

The products of fermentation are either microorganisms themselves, or substances synthesized by these

microorganisms (Russell, 1983). In the latter case, these may be biologically active products such as insulin or the penicillins. The hazards arising from exposure to these substances in the workplace depend on their pharmacotoxicological properties; the penicillins, for example, induce hypersensitive reactions (Russell, 1983). These properties are no different from those of the same product obtained by chemical catalysis and are assessed on the basis of protocols established for the chemical industry and the pharmaceutical industry: physicochemical and biological methods, toxicological studies.

1.3.2 Byproducts of fermentation

Fermentation procedures produce a number of unused or "undesirable" substances - metabolites, toxins, proteins and microbial cell debris - which contaminate the desired product. Their presence during extraction may have effects on those exposed to them; for example, there is the probable allergenic property of various microbial peptides (Landrigan, 1982). In fact, we know very little of the biological activity of these byproducts; some of them may have unrecognized toxigenic properties.

It is important to point out that these hazards are not restricted to workers in the biological industries. If we look, for example, at drugs obtained by biological

procedures, it is reasonable to assume that a product which is incompletely purified could have adverse effects on the patient to whom it is administered. This possibility raises the whole present-day problem of the purification and pharmacotoxicological assessment of products obtained by biological techniques.

As far as we now know, the hazards arising out of exposure to the byproducts of fermentation are less serious than those associated with the manipulation of the microorganisms themselves (Russell, 1983); however, such hazards do exist and we must consider safety measures to deal with them. The byproducts should therefore be subjected to an assessment of their general biological activity by means of appropriate toxicological studies (MARO, 1983). As in the pharmaceutical industry, they must be surrounded by precautions to ensure that manipulations can be performed safely: such precautions might include physical containment of byproducts, adequate ventilation of the working area and close adherence to strict methods of operation. Medical surveillance of workers, in the form of periodic examinations, may help to detect early symptoms of occupational diseases (Landrigan, 1982). At the same time, the possibility of contamination of the end product by microbial proteins, viral particles, nucleic acids or toxins will necessitate the improvement of methods of purification and elimination of contaminants in the course of production (MARO, 1983).

1.4 Cell cultures

For a number of years now, cell cultures have been used as substrates for the multiplication and growth of intracellular parasites in vaccine production. The technique is familiar to its users and involves little danger, so long as the safety rules which apply to the handling of these cells are observed. The culture of hybridomes - cell lines obtained by the fusion of two cells of different genomes in order, for example, to produce antibodies - represents a new application of cell-culture technique (MARO, 1983).

Because the cells produced by cell fusion or DNA recombination possess a different genome from that of the original cells, it is believed that the hazards associated with the manipulation of these cell lines produced by genetic recombination are similar in nature to the hazards arising from the manipulation of cells containing potentially dangerous genes (oncogenic genes, latent viruses, genes coding for substances harmful to man and the environment). However, the application of microbiological techniques and the observation of safety rules limit the risks to individuals handling these cell cultures in the laboratory.

It appears, finally, that the hazards associated with the use of cell cultures, altered or otherwise, are slighter than those arising out of the use of large quantities of microorganisms in fermenters because:

1. the physical containment levels required to preserve the integrity of the cells are very strict;

2. the cells in question are very fragile;

3. the hazards affect only those workers handling these cell cultures in the laboratory.

However, it appears important to proceed with analysis of the products of synthesis of any new virus-bearing cell line or any new line of hybridomes, in order to determine whether these substances possess toxigenic properties.

Chapter III

2.0 Hazards to the environment

The biotechnologies involve hazards not only to workers in the bio-industries, but also to the environment. These hazards are related to two principal factors: 1. the mass of wastes and organic and mineral byproducts produced by these technologies; 2. the exploitation of living microorganisms as agents in the synthesis of various substances and as agents in the alteration of living or inanimate material in processes taking place under closed (fermenter) or open (environment) conditions.

2.1 Industrial wastes and byproducts

2.1.1 Microorganisms

Repeated contamination of the environment by known or unknown microorganisms, microbial metabolites or cell debris, whether in the form of dense aerosols or through waste water, involves the same hazards as contamination of the workplace.

These hazards can be summarized again as follows:

1. colonisation of living beings by microorganisms foreign to the flora or the host, the consequences depending on the properties of the microorganisms involved;

2. sensitization to certain microbial proteins, leading to autoimmune diseases;

3. exposure to peptides or metabolites with unknown pathogenic, toxicogenic or immunogenic properties.

The problem here is to determine the survival value, outside the fermenter, of microorganisms altered by genetic recombination. As mentioned in the first chapter, the recombined microorganisms currently used in biotechnology are generally incapable of surviving for very long outside well controlled physicochemical conditions; however, the probable use, in the future, of less fragile microorganisms - in order to improve industrial procedures - could increase these microorganisms' chances of survival in a natural environment. In order for a genetically-engineered microorganism to present a danger on release into the environment, a number of conditions must be met: 1. the microorganism must be living when it is released into the environment; 2. it must be able to maintain its vital functions or transmit the genetic information acquired by in vitro recombination to microorganisms present in its new environment; 3. the product coded for by its recombinant DNA must be harmful to another living being, capable of altering a substance essential to survival or able to modify a substance of some economic value.

We should point out that studies have demonstrated that certain strains of genetically-engineered E. coli can survive in waste water long enough to

transmit their acquired antibiotic resistance factor to the microorganisms of the environment (Newman, 1982). The recombined microorganisms released as aerosols or in waste water (because they have become industrial wastes) are capable of colonizing ecological niches, of multiplying and of transmitting their new gene to microbial species in the environment, thus producing species with new characteristics, which may be harmful to other living beings. The colonization of the digestive tract in animals by cellulolytic coliforms responsible for undesirable degradation of food fibre is one example. Another is the development of autoimmune diseases caused by the emergence in the intestine of microbial populations possessing genes expressing animal proteins or analogues of such proteins.

Thus, a microorganism which is harmless in the environment for which it has been engineered - the fermenter - may become dangerous if it accidentally colonizes an ecological niche where its activity may lead to an imbalance in the ecosystem.

A number of safety measures can be suggested to reduce the hazards involved for the environment in the use of microorganisms in biological procedures. It would be appropriate

1. to monitor the integrity of the microbial populations used;

2. to study and predict the possible effects on the environment of massive dissemination of a new microorganism capable of surviving outside containment zones, before using it in fermenters;

3. to attempt to limit the production of dense aerosols;

4. to exercise surveillance over the appearance or resurgence of autoimmune diseases among workers in and those living in the vicinity of bio-industries.

2.1.2 Antibiotics

The use of antibiotics on a large scale in biological procedures could pose problems of an ecological nature. We know that the use of antibiotics in the agrifood industry has promoted the development of antibiotic resistance in animals. This microbial property has since been transmitted to human flora and today represents a serious public health problem (Holmberg, 1984). The release of antibiotics into the environment could produce the same consequences in other ecological niches.

In order to improve the safety surrounding the use of antibiotics in biological procedures, it is essential to prevent the release of any active antibiotic, in the form of dense aerosols or wastes, during and after the various stages of production.

It would be wise to perform periodic assessments of the degree of resistance to antibiotics of the microflora of workers in and those living in the vicinity of these industries, and the degree of hypersensitivity to antibiotics in these same individuals. Any increase in one of these symptoms over the long term could indicate health problems. Studies on the effects of localized (aerosol) or extensive (accidental) release of antibiotics in the vicinity of the bio-industries would help to determine the influence of these substances on the symbiotic fauna and flora or microorganisms likely to be the target of the antibiotics.

2.1.3 Chemical products and organic byproducts

As we stated in the preceding chapter, biological procedures necessitate the use of solvents and reagents. The hazards associated with the elimination of these substances arise, among other factors, from the mass of waste products (active or otherwise) which they represent: sewer overload during elimination of these substances may produce drastic modifications in environmental conditions.

Each industry represents a specific case, and for each one we must know: 1. the substances released into the environment, their concentration and the volume released, possible interactions among these substances (risk of diauxie, that is, preferential degradation by a microorganism of one substance rather than another (Atlas, 1980)); 2. their sensitivity to the mineralising

action of the microorganisms (Alexander, 1980) and the ability of the environment in general to alter them; 3. the byproducts of microbial degradation of these substances and their toxicity with respect to the parent substance, as in the case of the nitrite precursors of the nitrosamines (Alexander, 1980); 4. the targets of the toxigenicity of these substances, if any; 5. whether the physicochemical conditions of the environment affect the microbial degradation of these substances.

All this information will be necessary to determine the most appropriate method of treatment of the raw wastes and to identify the procedure of residue elimination which will have the fewest long-term effects on the environment at the waste disposal site.

2.2 Living microorganisms used as agents in processes occurring in the open

In the open, that is, in the environment, the hazards associated with the use of living microorganisms arise, as under closed conditions:

1. from the introduction into the environment of new genetically-engineered microorganisms;

2. from the use of large populations of microorganisms;

3. from the use of microorganisms pathogenic to man, animals and plants.

At the present time, microorganisms are used in the open:

1. in depollution procedures: detoxication of industrial wastes and waste water;

2. in the leaching of metals;

3. in agriculture;

4. in parasite control.

2.2.1 Microbiological depollution: detoxication of industrial wastes and treatment of waste water

While microorganisms are sensitive to the action of certain substances, they are themselves capable of affecting, or transforming, by enzymatic means, organic or mineral polluants found in urban and industrial effluents. The hasards associated with this microorganism property arise from the possibility that the microorganisms will transform substances present in the environment into byproducts (incomplete, derivative degradation) which are more toxic or more stable than the substance against which they are directed. Four types of undesirable byproducts may result from this process (Alexander, 1980):

1. a byproduct more toxic than the parent substance;

2. a byproduct having a toxic effect on a biological target, known or unknown, other than the target against which detoxication is directed;

3. a toxic byproduct which is only slightly degradable or nondegradable and which persists for a very long period in the environment;

4. a toxic byproduct capable of accumulating in living beings: this represents a hazard if, in the long term, it threatens to eliminate one or more links in a food chain within a given ecosystem.

It is important to acquire a precise understanding of the process involved in the degradation of a product or group of products (concomitant treatment) (Alexander, 1980), of the microorganism or microorganisms which participate in this degradation (cometabolization) (Alexander, 1980), of the byproducts generated and of the rate of this degradation before implementing a procedure based on microbiological depollution. This makes it possible 1. to select the most effective microorganisms on a given substrate; 2. to control the process of degradation and the resulting byproducts in order to limit as far as possible the effects which these substances may have.

The use of microorganisms in the treatment of waste water involves the same risks as the use of microorganisms in the elimination or detoxication of industrial wastes. However, the process of water depollution occurs in the open and not under closed or semi-closed conditions (detoxication lagoons); consequently, we have the risk of microbial contamination of the environment in addition to the hazards listed above in this section. Once again, then, the hazards and safety measures are listed in section 2.1.1.

2.2.2 Leaching of metals

The mining industry exploits the ability of certain microorganisms to extract metal from ore.

This biological extraction of metals occurs either directly, through enzymatic reaction during the production of ATP by the microorganisms involved, or indirectly, through the production of a powerful oxidizing agent (ferric ions) which will react with the metals and render them soluble (Brierley, 1982). Once the metals have been made soluble, they are collected by leaching and stored until they can be subjected to a final extraction, this time of a chemical nature, designed to purify the metals in question. At the present time, bioleaching is used to recover copper and uranium from low-grade ores (Brierley, 1982).

Since this procedure occurs in the open, it is influenced by climatic conditions and remains subject to external contamination. Leaching of metals in a fermenter is not yet feasible, since we do not know all the physicochemical conditions necessary to microbial metabolism or the details of the extraction process. This process may require cooperation between certain microorganisms, like that found between Leptospirillium ferrooxidans and Thiobacillus organoparus in the degradation of chalcopyrite (Brierley, 1982). However, the conditions governing these microbial interactions have not yet been clearly defined.

The microorganisms used in the leaching of metals are present in the soil in the natural state; they become the dominant species in terms of numbers within their environment as a result of artificial modification of the telluric physicochemical conditions (acid pH, oxygenation). These microorganisms are not the product of genetic manipulation and, given the little we now know about bioleaching, it is unlikely that new and more effective strains will be created in the laboratory within the near future.

Biological extraction of metals has fewer harmful effects on the environment than traditional mining procedures, since it releases no gas or heat; it is a slow procedure, performed on extremely circumscribed sites and requiring little energy. Furthermore, the microorganisms occur in the wild on the extraction sites. However, certain microorganisms currently absent from mining sites have proven capable of proliferating there. These species, including Sulfolobus acidocaldarius and Pseudomonas aeruginosa, could represent a hazard to the environment if, after contaminating the extraction sites, they were to become the dominant species in terms of numbers. Because these microorganisms can accumulate large quantities of toxic metals, such as molybdenum or uranium, their proliferation on a mining site could eventually bring about the formation of telluric pockets with high concentrations of toxic metals which could prove detrimental to the immediate environment.

At the present time, biomining presents no substantial risks. Surveillance of the microbial populations present on the extraction sites and monitoring of soil composition are the only safety measures which can be suggested for the moment. However, it would be useful to have a better understanding of the physiology of the microorganisms in question and of the microbial interactions necessary for the leaching process, to enable us to evaluate more effectively the impact of this procedure on the environment.

2.2.3 Agriculture

Massive use of living microorganisms in agriculture in currently limited to the introduction of Rhizobium type microorganisms to improve nitrogen fixation and thus to enhance legume production (Brill, 1981). Consideration is also being given to the use of other microorganisms, such as Frankia alni to improve nitrogen fixation in poplars, Pisolithus tinctorius to increase root absorption capacity in the pine and Pseudomonas aeruginosa to increase the resistance of potatoes to cold.

We do not know the nature of the interactions or exchanges which occur among microorganisms living in the wild in a given environment and those which are artificially introduced. Nor do we know whether the improvement of certain species of plants could lead to imbalances in the ecosystems to which these plants belong.

The application of biological procedures in agriculture does not appear to present serious risks to man and animals, but studies will be required to determine the influence of the microorganisms used as fertilising agents on the flora, fauna and microorganisms of the ecological niches to which these procedures are applied.

2.2.4 Parasite control

In view of the harmful effects of certain chemical pesticides, researchers have studied the possibility of using microorganisms as pesticides: for example, Bacillus thurigiensis can be used against leaf-eating caterpillars.

The use of biological pesticides, however, may involve certain hazards. In fact, certain microorganisms used as pesticides may pose problems of an ecological nature if their host range is too broad or imperfectly understood. In this case, there would be a risk 1. of destroying microbial, animal or plant populations other than those intended for attack; 2. of compromising the equilibrium of the ecosystem in which biological pesticides are applied.

Before using massive quantities of microorganisms as pesticides, pilot studies must be conducted to determine: 1. which living beings these microorganisms can colonise; 2. the effects of such microbial colonisation; 3. its persistence; 4. the long-term

effects of the use of biological pesticides.

In general, the hasards to the environment presented by biotechnology are less well known than the risks to man of infection and intoxication already defined. It is for this reason that studies will have to be conducted to identify these risks more fully. It is important to point out, too, that accidents which may occur in the environment do not develop abruptly; as a result, it is possible to analyse the situation and to look for solutions.

Chapter III

3.0 Avenues of research

Biotechnological safety requires knowledge of the processes involved and the development of adequate regulations and guidelines. However, as we have seen, the biotechnologies involve hazards which are as yet inadequately defined: numerous avenues of research are therefore open in this field.

The present chapter reviews most of the avenues of research presented in chapters I and II (some of which have already been examined by the NIH), then presents areas of research and safety measures which, we believe, should constitute today's priorities for research laboratories and industries using advanced biological techniques. A list of questions raised by the manipulation and release into the environment of genetically-engineered microorganisms appears in another form in the appendix (Rissler, 1984).

3.1 Workplace

3.1.1 Use of microorganisms:

a) Development of more effective methods of physical containment of microorganisms:

- primary containment methods (confinement enclosure, fermenter);

- secondary containment methods (application of aseptic techniques to the area surrounding the primary containment facilities).

b) Development of new methods of biological containment: the production of microorganisms with progressively lower survival value outside their culture medium.

c) Development of medical surveillance programs for the early detection of occupational diseases in workers, that is:

- hypersensitivity to antibiotics or other substances;

- resistance to antibiotics;

- autoimmune diseases;

- colonization by microorganisms.

d) Study of the microorganisms used in biotechnology, their properties and genomes. It should be noted that this type of study constitutes an essential avenue of research in all fields of biotechnology in order to improve procedure safety and to ensure the quality of the end product.

3.1.2 Products and byproducts of fermentation:

a) Evaluation of the biological activity of the byproducts of fermentation.

b) Development of methods of identification of the effects of the products and byproducts of fermentation in workers.

c) Development of methods of purification of the products of fermentation (detection of toxins, pyrogens, etc).

d) Development of methods of destruction of the microorganisms in production.

3.1.3 Cell cultures

Development of methods of analysis of the properties and biological activity of the substances synthesized by hybridomes and by virus-bearing cells.

In short, research on biotechnological safety in the workplace is designed to improve the techniques for containment of the microorganisms used and of their products, and the detection of occupational diseases.

3.2 Environment

3.2.1 Industrial wastes and byproducts of biotechnologies

Microorganisms

a) Development of methods of monitoring the integrity of the microbial populations used.

b) Study and prediction of the effects of massive dissemination into the environment of the microorganisms used in fermenters.

c) Development of techniques to limit the release of dense aerosols of microorganisms.

d) Development of programs of medical surveillance of workers and individuals living in the vicinity of biotechnological industries (see 3.1.1 c).

Antibiotics

a) Development of techniques to limit the release of aerosols of active antibiotics and to permit pretreatment of antibiotics prior to their discharge in waste water.

b) Development of programs of medical surveillance to assess the effects of the antibiotics on individuals living in the vicinity of biotechnological industries (see 3.1.1 c).

Byproducts

a) Study of the chemical products used in biological procedures and of the byproducts generated by these procedures.

- To determine whether these substances can be affected by the mineralising action of the microorganisms;

- whether they can be altered by the environment;

- to identify the byproducts of their degradation or metabolisation by microorganisms present in the environment;

- to determine whether they possess toxigenic properties and, if so, to identify the targets of such toxigenic properties;

- to assess the influence of physicochemical conditions on their microbiological degradation.

b) With the help of the data obtained in a), development of elimination procedures which will cause the least possible damage to the environment.

c) Development of detoxication methods based on the use of microorganisms.

3.2.2 Detoxication of industrial wastes and treatment of waste water:

a) Study of the processes of degradation, by microorganisms, of substances eliminated in the form of wastes.

b) Development of better methods of waste water treatment.

3.2.3 Leaching of metals:

The development of programs to monitor microbial populations and variations in soil composition on extraction sites represent important areas of research in the field of biosafety.

3.2.4 Agriculture:

Study of the interactions among microorganisms produced by genetic engineering and native microorganisms, fauna and flora of the ecological niches to which biological agricultural procedures are applied.

3.2.5 Parasite control:

a) Pilot studies to determine which living beings are colonised by the microorganisms used in biotechnological procedures.

b) Study of the effects of this microbial colonisation.

c) Determination of the duration of this colonization.

d) Study of the long-term effects on the environment of the use of biological pesticides.

The aims of this new research in the field of biotechnological safety in relation to the environment can be summarized as follows:

- to predict the effects of the dissemination into the environment of microorganisms and wastes generated by biological procedures under closed conditions;

- to prevent the dissemination of microorganisms or hazardous products into the environment;

- to improve detoxication procedures;

- to predict the effects of the use of microorganisms in the open (agriculture, leaching of metals, depollution, parasite control) on man, and on the fauna, flora and microorganisms where biological procedures are applied.

As we can see, biotechnological safety in the workplace and in the environment offers numerous topics for research.

3.2.6 Priorities

The authors have attempted to define a number of priorities in this area.

In the workplace, the need is to develop methods for early diagnosis of workers:

1. protocols for monitoring workplace quality;

2. protocols for medical surveillance, including examinations and periodical analyses, for example, in immunology:

   - methods for the detection of allergens (enzymes, cell debris);
   - methods for the detection of allergic reactions (cutireaction, etc);

- methods for the early detection of auto-immune diseases.

3. In the environment, the need is to develop methods for the detection of microorganisms released into the surroundings, either deliberately or accidentally:

   - methods for the rapid detection of leaks and dissemination of microorganisms into the environment based on the use of harmless indicators:

   - methods permitting determination of the "microbial pattern" in the vicinity of bio-industries; this involves the development of techniques for sampling and identifying microorganisms present in the environment as a result of the establishment of these industries;

   - methods for the control of the transmission to the microflora of man and animals of microbial properties such as antibiotic resistance.

Chapter IV

4.0 Guidelines and regulations

4.1 Canada

The first Canadian guidelines regarding safety in experiments with genetic engineering were published in 1978 by the Medical Research Council. A second edition appeared in 1980 (MRC 1980).

These guidelines deal not only with recombinant DNA, but also with cell cultures and animal viruses. However, there are no guidelines for handling pathogenic bacteria.

The MRC guidelines relate primarily to laboratory work. As regards high-volume cultures, the guide simply points out that the risks increase with the volume or concentration of the microorganisms used, and offers no further advice on the subject.

The first section of the guide defines Canada's six containment levels, ranging from level A, the lowest, to level F, the strictest. The following table, taken from the Guidelines, consists of a comparison of Canadian, American and British containment levels.

Canada (MRC)	United States (NIH)	Britain
A	P1	-
B	P2	I
C	P2 - P3	II
D	P3 - P4	II - III
E	P3 - P4	III
F	P4	IV

(MRC, 1980)

The second section of the guide covers containment requirements for genetic manipulations and virological experiments.

Let us look briefly at the safety regulations relating to genetic engineering. Some experiments, including autocloning or DNA recombination in vitro, are not subject to any regulation. In contrast, other types of experiments require the authorization of MRC's Biosafety Committee, in addition to observation of strict guidelines: these include the cloning of genes from viruses requiring level E or F physical containment; large-scale experiments on organisms containing recombinant DNA, if the DNA is fully characterized and contains no virulence genes; dissemination into the environment of microorganisms containing recombinant DNA. The guide also deals with intermediary cases to which containment levels A and B; it specifies, in addition, that any experiment requiring a containment level higher than B must receive prior authorization from MRC's Biosafety Committee. It should be noted that physical containment may be reduced

through the use of biological containment. The latter includes four different levels: low, moderate, high and very high.

It is important to mention that research laboratories and universities comply with the MRC Guidelines and that fully structured local biosafety committees operate in these establishments.

Furthermore, in addition to MRC, there are other agencies which are concerned with biotechnological safety. In fact, the Division of Biosafety of the Bureau of Infection Control of the Health Protection Branch has set up a number of programs relating to various aspects of biosafety: these include advisory services for microbiology laboratories, assessments of containment facilities, a laboratory safety program and an information service on accidents and cases of infection in the laboratory.

Other federal agencies deal with biosafety:

- For example, the Departments of the Environment and of Agriculture are concerned with the impact of new technologies on the environment and regulate the discharge of potentially toxic substances into the environment.

- The Science Council of Canada has recently published a report in which the author, Sheldon Krimsky, clearly defines the problems posed by the regulation of

biotechnology in relation to existing federal administrative and legislative structures (Krimsky, 1984). The author proposes the amendment of the existing legislation in order to satisfy the needs created by biotechnology in terms of regulation.

- We can anticipate a developing interest in the question of biotechnological safety on the part of the provincial Departments of Labour, the Environment and Agriculture. The Secrétariat à la Science et à la Technologie du Québec, now the Ministère de la Science et de la Technologie, for example, has developed a program entitled A l'heure des biotechnologies. This program provided for the creation of an ad hoc commission on biosafety, which has published a report on the regulations in effect in Canada and in other countries (SST, 1982).

4.2 United States

The American guidelines (NIH, 1983) deal solely with the handling of recombinant DNA, unlike the Canadian guidelines, which regulate the handling of animal viruses and cells as well. Published in 1976 by the NIH, the American regulations have become more flexible with successive revisions, the most recent edition having appeared in 1983. Originally, these

American guidelines applied only to research funded by the NIH, but since November 1976, the guidelines have become compulsory for all research projects funded by American federal agencies.

The American regulations establish four levels of physical containment, ranging from P1, the lowest, to P4, the strictest (see page 37 for a comparison with Canadian containment levels) and two levels of biological containment: HV1 and HV2.

It is possible to combine physical and biological containment to reduce the risk of accidental dessemination of organisms bearing recombinant DNA and their vectors. It should be pointed out that any vector-host system proposed as a means of biological containment must be approved by the Recombinant DNA Advisory Committee (RAC) of the NIH before laboratory experiments may proceed.

With the development of industrial applications of genetic engineering, the NIH created a subcommittee of the RAC, to which it assigned the task of assessing the hazards of large-scale use of microorganisms containing recombinant DNA. Through the work of this subcommittee, it has been possible to adapt physical containment levels P1, P2 and P3 to industrial production (cultures of genetically-engineered microorganisms in volumes greater than 10 litres). These containment levels are known as P1-LS (LS for "large scale"), P2-LS and P3-LS.

In February 1984, the Committee on Science and Technology of the US House of Representatives published a report entitled The Environmental Implications of Genetic Engineering.

According to this report, the diffusion into the environment of organisms produced by genetic engineering involves few hazards, but hazards of some importance. In order to clarify this statement, let us look first at the sequence of events through which a microorganism may become dangerous to man and the environment: the integration of a foreign gene into the DNA of a microorganism, its release, survival and multiplication in the environment, followed by contamination of living organisms and any resulting damage (Rissler, 1984). Since the probability than a microorganism will adversely affect other living beings is equal to the product of the probability of each of these events, it appears that the hazards to man and the environment are limited if the probability of each of these events is low, as seems the most likely hypothesis at the present time. We should point out that this observation does not in any way minimize or ignore the gravity of the consequences of a potential ecological accident.

The authors of The Environmental Implications of Genetic Engineering feel that the current regulations do not permit either early identification or rapid intervention in the event of an accident occurring in the environment; they therefore propose that the Environmental Protection Agency (EPA) be given jurisdiction over all matters relating to dissemination in the environment of genetically-engineered organisms and not currently regulated by legislation. In April 1984, in response to the recommendations expressed in the report, the NIH created a working group on the dissemination of genetically-engineered organisms into the environment. This group is subordinate to the RAC.

This brief analysis of the American guidelines reflects a concern to adapt the safety rules to the new situations generated by industrial applications of genetic engineering and other advanced biological techniques. Obviously, this continual adaptation to scientific and technological realities demands continual research to direct those responsible for developing these rules.

4.3 Great Britain

The British guidelines on biotechnological safety are similar to those of the United States; however, they are included as part of Britain's occupational health and safety legislation. In addition, all research projects, in industry and universities alike, must be approved by two government agencies: the Health and Safety Executive and the Genetic Manipulation Advisory Group. As in Canada and the United States, local biosafety committees are responsible for the application of the guidelines.

4.4 France

France too follows the American model. A Commission of the Délégation générale à la recherche scientifique et technique (DGRST) issues guidelines to be observed by all agencies which have signed agreements with the DGRST or which receive funding from it. Local committees then monitor the application of the DGRST guidelines.

We feel that the Canadian biotechnology regulations should be based on the existing legislation in the area of health and environmental protection and, in particular, that the framework should be based on guidelines which, because of their non-coercive nature, can facilitate the concomitant evolution of familiarity with the safety rules and the development of biotechnology.

Chapter V

5.0 Fears of a sociopolitical nature

The fears expressed with respect to the hazards associated with biotechnology arise primarily in the scientific world and in well informed circles, since the general public is not yet aware of the developments in advanced biological techniques (Rifkin, 1984).

Some fear that biotechnology will become a deadly weapon in the hands of the powers which govern this planet, through the development of biological bombs and East-West escalation, as has been the case with nuclear weapons (Smith, 1984).

Another fear arises from the possibility of producing overly effective bacteria. For example, bacteria capable of digesting lignin might conceivably attack living trees and destroy part of the biomass (Miller, 1984).

Biological leaching of ore results in acidification of the environment as a result of the production of sulphuric acid by the bacteria involved. Fears in this connection relate to the possibility of acidification of fresh water reserves (Miller, 1984).

Now that the possibilities of genetic recombination have overcome the obstacle which once existed between species - a human gene, for example, can be integrated with the DNA of a mouse - there is some fear that monsters may be created, animal species affected by gigantism or other imbalances.

This progress in genetic engineering is arousing deep concern as to the future of man. The possibility of creating docile and productive reprogrammed human beings appalls some observers, although with our current knowledge we can only modify a few genes in certain bacteria and experiments with animals are far from convincing.

In general, the fears aroused by the development of biotechnology are based on arguments relating more to hypothesis than to reality. These fears can be relieved only by:

1. A critical assessment of the hazards based on experimental data, which are as yet inadequate or nonexistent. In this connection, we feel that priority should be given to the development of a methodology for assessment of the hazards. New techniques must also be developed to reduce the hazards to the staff of the bio-industries and to the environment. It is becoming necessary to study the safety of a biological procedure, not only at the industrial application stage, but at the design and development stages as well. Research must be directed towards the needs of industry and, more specifically, towards those safety aspects which may be overlooked by industry.

2. The dissemination of information on advanced biological techniques. It is essential that scientists, the relevant authorities and the public be adequately informed if they are to adopt a rational and constructive attitude to applications of the new scientific discoveries relating to biotechnology.

CONCLUSION

Biotechnological safety depends essentially on a knowledge of the hazards associated with these new techniques.

In the workplace, the hazards relate primarily to the possibility of leakage of microorganisms from containment facilities and exposure to the products and byproducts of fermentation and cell cultures. The hazards include the possibility of infection, intoxication, sensitization and transmission of dangerous microbial properties to man. The solutions: improvement of physical and biological containment methods, medical surveillance of the staff of the bio-industries, rigid observation of aseptic techniques and research into methods for the assessment of hazards and the detection of microorganism leakage.

In the environment, the hazards relate primarily to the possibility of infection and intoxication of living beings in the ecological niches into which microorganisms are deliberately released, the transmission of microbial properties to the microflora of these ecological niches, the production of toxic substances, the modification of the physicochemical conditions of the environment and consequent imbalances within a given ecosystem. The solutions: development of methods for the assessment of these risks and the performance of pilot studies prior to massive dissemination of microorganisms into the environment.

At the present time, the development of techniques for the detection of microorganism leakage, of methods and programs for

the detection of the adverse effects of the biotechnologies on individuals exposed to these hazards should constitute a research priority in the field of biotechnological safety.

It seems advisable that the biotechnologies be subject to guidelines rather than regulations, since guidelines can be modified more readily as our knowledge of the hazards involved develops. At the present time, the guidelines deal primarily with experiments in genetic engineering and the handling of microorganisms in the laboratory; however, the agencies responsible for biotechnological safety are now beginning to adapt these safety rules to industrial procedures.

Fears of a sociopolitical nature arise not only out of actual hazards, but also out of a lack of information and experimental data on these hazards. The fears created by biotechnology can be relieved to the extent that these gaps are filled.

Finally, we would like to conclude this study by expressing certain hopes with regard to the fields of activity of the Institute of Biotechnology.

1. We feel that the Institute should include the study of the various facets of biotechnological safety among its principal objectives.

2. The policy of the Institute with regard to biotechnological safety should be centred primarily on research and development, and on information.

The first objective involves the acquisition of knowledge through research performed primarily on an extramural basis (on contract, through temporary partnerships or through longer-term agreements with associated teams).

The second objective requires the establishment within the Institute of a reference and advisory centre on biotechnological safety, to provide information appropriate to the needs of those most directly concerned: industry, research agencies and the relevant departments.

APPENDIX

General Question Proposed for Research on Biotic Environmental Effects of Deliberately-Released Genetically-Engineered Microorganisms (GEMs). Questions are Delineated According to Series of Events Leading to Harm

EVENT	QUESTIONS
1. Incorporation of gene for hazardous trait into microorganisms	a. Can the "new" part of the genome be thoroughly characterized to assure that genes for undesirable traits are not intentionally or unintentionally included? How?
	b. To what extent can the GEMs, their products, and their intended uses be characterized before release?
	c. Will any GEMs (other than those intended for use as pesticides) carry genes (either "new" or part of original remaining genome) for traits hazardous to natural plants, animals, microbes or biological processes?
	d. Based on the knowledge and extent of genetic-engineering techniques used, is it possible to delineate different sets of GEMs which differ in likelihood of harm? How?
2. Survival in the environment.	a. Can the GEMs be specifically identified and detected in nature? How?
	b. Can the population size be determined at sufficiently low levels? How?
	c. Do the organisms survive in the environment in which they are placed or to which they are transported?
	d. Are the means of transport significant in initiating new populations in similar or different environments?
	e. Can the organisms be engineered to survive only in particular environments? How?
	f. What are the natural levels of the non-engineered parent organisms?

APPENDIX (continued)

EVENT	QUESTION
	g. Do the GEMs have a selective survival advantage over the unaltered members of the species?
	h. Are the GEMs as stable genetically as the unaltered members of the species?
3. Multiplication in the environment	a. What is the quantitative population change over time in the environment in which the organisms are placed or to which they are transported?
	b. What environmental conditions affect multiplication and persistence? How?
	c. In these environments do the GEMs have a selective advantage over the unaltered members of the species?
	d. Can important environmental growth requirements be exploited to control or contain the microorganisms? How?
	e. Can the GEMs be engineered to multiply only in particular environments? How?
4. Contact with species or biological systems that the microorganisms can injure	a. What species or biological systems are exposed to the microorganisms?
	b. Is knowledge of the exposures associated with the unaltered parent organisms sufficient to predict the exposures of the engineered organisms?
	c. Do the intented pattern of use and knowledge of means of transport predict the species or systems to be exposed?
	d. What are the magnitude, frequency, duration and routes of exposure?
	e. Are existing exposure assessment methodologies for microorganisms satisfactory for GEMs?
	f. Can engineered genes or other genes be transferred in nature to other organisms? Which ones?
	g. Can genes from other organisms be transferred to GEMs more readily than to naturally-occuring ones? Why?
5. Causing harm	a. Do hazards exist with GEMs which would not be revealed with existing methodologies for identification of hazards associated with naturally-occuring microorganisms?

EVENT	QUESTION
	b. Can GEMs be subjected to a sufficient diversity of environments such that all "new" genes will be expressed?
	c. Is knowledge of the hazards associated with the unaltered parent organisms sufficient to predict the hazards associated with engineered organisms?
	d. Do GEMs have unique dose-response relationships or thresholds of activity that cannot be predicted from knowledge of unaltered parent organisms?
	e. What level of characterization of gene segments is sufficient to predict associated adverse effects? (i.e. is it possible to develop gene segment-activity relationships?)
	f. Can guidelines be developped for testing for adverse effects?

APPENDIX (continued)

EVENT	QUESTION
	b. Can GEMs be subjected to a sufficient diversity of environments such that all "new" genes will be expressed?
	c. Is knowledge of the hazards associated with the unaltered parent organisms sufficient to predict the hazards associated with engineered organisms?
	d. Do GEMs have unique dose-response relationships or thresholds of activity that cannot be predicted from knowledge of unaltered parent organisms?
	e. What level of characterization of gene segments is sufficient to predict associated adverse effects? (i.e. is it possible to develop gene segment-activity relationships?)
	f. Can guidelines be developped for testing for adverse effects?

LIST OF SOURCES CONSULTED

1. ALEXANDER, Martin (1980). "Helpful and Fallible Microorganisms: Importance in Transformation of Chemical Polluants", Microbiology, Washington, DC, American Society for Microbiology, D Schlessinger ed, pp 328-332.

2. ATLAS, Ronald S (1980). "Some Considerations on the Microbial Transformations of Organic Polluants: Microorganisms, Degradation, and Toxicity of Complex Mixtures", Microbiology, Washington, DC, D Schlessinger ed, pp 339-340.

3. BRIERLEY, Corale L (1982). "Microbiological Mining", Scientific American, 247 (2), pp 44-53.

4. BRILL, Winston J (1981). "Agricultural Microbiology", Scientific American, 245 (3), pp 198-215.

5. HOLMBERG, Scott D (1984). "Drug Resistant Salmonella from Animals Fed Microbials", The New England Journal of Medicine, 311 (10), pp 617-622.

6. KRIMSKY, Sheldon. Regulatory Policies on Biotechnology in Canada. A manuscript report prepared for the Science Council of Canada. October 1984.

7. LANDRIGAN, Philip J et al (1982). "Medical Surveillance of Biotechnology Workers. Report of the CDC NIOSH ad hoc Working Group on Medical Surveillance for Industrial Applications of Biotechnology", Recombinant DNA Technical Bulletin 5 (3), pp 133-138.

8. MRC - Medical Research Council of Canada (1980). "Guidelines for handling recombinant DNA molecules and animal viruses and cells".

9. MARO - MAZUE, G and R RONCUCCI. "Réflexions sur les études toxicologiques des médicaments issus des biotechnologies", Biofutur, May 1983, pp 33-35.

10. MILLER, Judith. "Harmful Environmental Effects of Biotechnology Consequences of Deliberate Release", paper prepared for "The Regulation of Biotechnology", a conference sponsored by the Canadian Environmental Law Research Foundation, Toronto, Ontario, October 9, 1984.

11. NIH - National Institute of Health, DHHS (1983). "Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules". Federal Register, 48 (106), pp 24,556-24,581.

12. NEWMAN, Stuart A. "Toxicology of Biotechnological Products: Environmental Considerations", 15th annual conference of the Society of Toxicology of Canada, "Challenges in Pharmaceutical Technology", Montreal, November 30, 1982.

13. PHAFF, Norman J (1981). "Industrial Microorganisms", Scientific American, 245 (3), pp 76-89.

14. RECD. "Meeting of the Large-Scale Review Working Group of the Recombinant DNA Advisory Committee" (1983). Recombinant DNA Technical Bulletin, 6 (1), pp 19-24.

15. RIFKIN, Jeremy. Paper prepared for "The Regulation of Biotechnology", a conference sponsored by the Canadian Environmental Law Research Foundation, Toronto, Ontario, October 9, 1984.

16. RISSLER, Jane F (1984). "Research Needs for Biotic Environmental Effects of Genetically-Engineered Microorganisms", Recombinant DNA Technical Bulletin, 7, pp 20-30.

17. RUSSELL, Derek. "Safety Considerations in Biotechnical Processing", Process Engineering, August 1983, pp 18-21.

18. SST - Secrétariat à la science et à la technologie. Gouvernement du Québec. "A l'heure des biotechnologies. La biosécurité". Rapport de la mission ad hoc sur la biosécurité, 1982.

19. SMITH, Jeffrey R (1984). "The Dark Side of Biotechnology", Science, 224 (4,654), pp 1215-1216.

National Research Council Canada
Conseil national de recherches Canada

LA SÉCURITÉ DES BIOTECHNOLOGIES

OCTOBRE 1984

LA SÉCURITÉ DES BIOTECHNOLOGIES

Rapport présenté au

Conseil national de recherche du Canada

Jean-Claude Panisset, D.M.V., Ph.D.
Chargé de projet
Professeur titulaire
Département de médecine du travail
et d'hygiène du milieu
Université de Montréal

Alexandre Sasarman, M.D., D.Sc.
Professeur titulaire
Département de microbiologie
et d'immunologie
Faculté de médecine
Université de Montréal

F. Pierre Dussault, Ph.D.
Biochimiste-conseil
en santé et en sécurité du travail
3431, av. Laval
Montréal H2X 3C7

Gérard Ozanne, Ph.D.
Professeur adjoint
Département de microbiologie
et d'immunologie
Faculté de médecine
Université de Montréal

Marie L'Écuyer, B.Pharm., L.Pharm.
Rédactrice
5576, rue Plantagenet
Montréal H3T 1S2

Octobre 1984

TABLE DES MATIÈRES

	Page
INTRODUCTION	1
Chapitre I	
1.0 Les risques en milieu de travail	5
1.1 Utilisation de microorganismes	5
1.1.1 Utilisation de grandes populations de microorganismes	5
1.1.2 Utilisation de microorganismes modifiés	6
1.1.3 Utilisation de microorganismes pathogènes	7
1.2 Procédés biologiques et industrie chimique	9
1.3 Produits et sous-produits des biotechnologies	10
1.3.1 Produits des fermentations	10
1.3.2 Sous-produits des fermentations	11
1.4 Cultures de cellules	13
Chapitre II	
2.0 Les risques pour l'environnement	15
2.1 Déchets industriels et sous-produits	15
2.1.1 Microorganismes	15
2.1.2 Antibiotiques	18
2.1.3 Produits chimiques et sous-produits organiques	19
2.2 Microorganismes vivants utilisés comme agent d'un processus ayant lieu en milieu ouvert	20
2.2.1 Dépollution microbiologique: détoxication des déchets industriels et traitement des eaux usées	21
2.2.2 Lixiviation des métaux	23
2.2.3 Agriculture	25
2.2.4 Lutte contre les parasites	26

Chapitre III

3.0 Les avenues de recherche 28

3.1 Milieu de travail 28

3.1.1 Utilisation des microorganismes 28

3.1.2 Produits et sous-produits des fermentations 29

3.1.3 Cultures de cellules 30

3.2 Environnement 30

3.2.1 Déchets industriels et sous-produits des biotechnologies 30

3.2.2 Détoxication des déchets industriels et traitement des eaux usées 32

3.2.3 Lixiviation des métaux 33

3.2.4 Agriculture 33

3.2.5 Lutte contre les parasites 33

3.2.6 Priorités 34

Chapitre IV

4.0 Les directives et la réglementation 36

4.1 Canada 36

4.2 États-Unis 39

4.3 Grande-Bretagne 42

4.4 France 42

Chapitre V

5.0 Les craintes d'ordre socio-politique 44

CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS 46

ANNEXE 49

LISTE DES SOURCES CONSULTÉES 50

INTRODUCTION

Grâce aux progrès spectaculaires réalisés dans le domaine du génie génétique depuis une dizaine d'années, les biotechnologies sont en train de connaître un essor important. En effet, les manipulations génétiques vont permettre d'augmenter considérablement les possibilités d'utilisation des fonctions biologiques dans la production de biens et de services. Mais si les biotechnologies soulèvent aujourd'hui de grands espoirs, elles suscitent également de grandes craintes. D'une part, on espère trouver de nouvelles sources d'énergie, augmenter la production alimentaire, guérir les maladies héréditaires et éliminer le cancer; d'autre part, on craint d'engendrer de nouvelles maladies, une pollution microbienne dévastatrice et des êtres humains "reprogrammés". Précisons tout de suite que ce dernier danger est loin d'être imminent compte tenu des connaissances scientifiques actuelles et qu'il déborde le cadre de la présente étude. Sous cette réserve, les craintes précitées correspondent à des risques réels qu'il s'agit d'analyser pour être ensuite en mesure de les réduire au minimum.

C'est pour évaluer ces risques et pour ébaucher un ensemble de règles visant à assurer la sécurité des expériences en génie génétique que se réunissait un groupe de scientifiques à Asilomar, en 1975. L'année suivante, le National Institutes of Health des États-Unis (N.I.H.) publiait une première série de directives. En 1978, le Conseil de recherches médicales du Canada (C.R.M.) publiait à son tour des règles de sécurité touchant non seulement la recombinaison de l'ADN, mais aussi les cultures de cellules et de virus.. Pour sa part, la Grande-Bretagne a donné force de loi à ses règles de sécurité qui sont intégrées dans une loi sur la santé et la sécurité au travail. Il importe de signaler que l'industrie chimique et l'industrie pharmaceutique ont dû se doter de règles de sécurité comme pour toute industrie comportant des risques pour l'environnement, celles qui recourent aux techniques biologiques n'échappent pas à cette nécessité.

À l'heure actuelle, on peut considérer que les règles de sécurité visant à éliminer les risques d'infection dans les laboratoires sont adéquates: il existe de bonnes techniques d'asepsie pour la manipulation de microorganismes, des méthodes de décontamination pour le matériel de laboratoire, des dispositifs de stérilisation de l'air pour les zones de travail où le risque de contamination est plus important. Par contre, les guides de sécurité restent très sommaires pour tout ce qui touche l'utilisation et la libération dans l'environnement de quantités massives de microorganismes. On constate donc qu'il y a des lacunes à combler en matière de sécurité, les risques des procédés biologiques industriels n'étant pas bien définis. C'est dans ce contexte que nous avons proposé au Conseil national de recherche du Canada d'étudier la sécurité des procédés biologiques industriels mettant en oeuvre de grandes quantités de microorganismes ou de cellules somatiques. Cette étude veut répondre aux objectifs suivants:

1. Identifier et évaluer les risques que comportent les biotechnologies pour l'homme et l'environnement.

2. Examiner les directives appliquées aux techniques biologiques de pointe et dégager l'orientation des travaux en cours dans le domaine.

3. Analyser les craintes d'ordre socio-politique suscitées par le développement des biotechnologies.

4. Orienter l'Institut de biotechnologie dans ses politiques de recherche et de développement en définissant le type de recherche nécessaire et les principales avenues à explorer.

Les risques reliés aux biotechnologies se retrouvent sur deux plans principaux:

1. d'abord, en milieu de travail, où l'on manipule des micro-organismes et des cellules dans des limites de confinement - les fermenteurs - afin de produire hormones, médicaments, solvants et acides organiques;

2. ensuite, pour l'environnement, où d'une part, on déverse les déchets des fermentations effectuées en milieu fermé (fermenteurs) et où, d'autre part, on laisse pénétrer volontairement des microorganismes à des fins variées comme la lixiviation des métaux, la fertilisation du sol, l'élimination d'insectes nuisibles, le traitement des déchets et des eaux usées ou même l'extraction du pétrole.

Les deux premiers chapitres traitent de ces deux questions. Le premier chapitre présente les problèmes qui proviennent de l'utilisation des microorganismes et de cellules somatiques en milieu de travail, des risques reliés aux procédés ainsi qu'à la manipulation des produits des fermentations. Dans chaque cas suivent une évaluation de ces risques et des suggestions sur les mesures de sécurité à observer et les avenues de recherche à explorer.

Le deuxième chapitre porte sur les risques des biotechnologies pour l'environnement. On y traite de la question des déchets industriels et des sous-produits des fermentations qui sont déversés dans l'environnement, pour aborder ensuite la question de l'utilisation de microorganismes comme agents biologiques de différents processus ayant lieu en milieu ouvert: des applications possibles dans ce domaine (dépollution, agriculture, etc.) et des problèmes qui s'y

rattachent. Comme au chapitre précédent, chaque cas fait l'objet d'une description des caractéristiques de la situation et des risques qui en découlent, d'une évaluation de ces risques et de propositions quant à des mesures de sécurité et à des avenues de recherche possibles.

Au troisième chapitre, les auteurs reprennent sous forme d'énumération toutes les avenues de recherche proposées aux chapitres I et II, puis identifient certains domaines de recherche qu'ils jugent prioritaires.

Au quatrième chapitre, les auteurs examinent les règles de sécurité appliquées au Canada, aux États-Unis, en Grande-Bretagne et en France, signalent les organismes ayant un rôle à jouer dans l'élaboration de ces directives et dégagent les tendances actuelles dans le domaine de la sécurité des biotechnologies.

Au cinquième chapitre, il est question des craintes socio-politiques suscitées par les biotechnologies.

Finalement, les auteurs émettent des propositions visant à orienter l'Institut de biotechnologie dans ses politiques de recherche et de développement en matière de sécurité.

Chapitre I

1.0 Les risques en milieu de travail

Le procédé industriel de la fermentation comporte une série d'étapes - préparation du substrat, fermentation proprement dite, extraction et purification - chacune de ces étapes comportant un certain nombre de risques qu'on peut répartir en trois catégories:

- les risques reliés à l'utilisation de microorganismes;
- les risques reliés aux procédés;
- les risques reliés aux produits.

1.1 Utilisation des microorganismes

1.1.1 Utilisation de grandes populations de microorganismes

Durant les étapes de fermentation et d'extraction, il peut se former des aérosols denses de microorganismes à l'extérieur des fermenteurs. À l'heure actuelle, l'industrie dispose de fermenteurs pouvant contenir des volumes énormes de culture et les experts sont d'accord sur le fait que si l'industrie recourt de plus en plus à des procédés mettant en oeuvre de très grandes quantités de microorganismes (fermenteurs d'une capacité de 30 000 à 150 000 L de culture), il sera pratiquement impossible d'assurer de manière absolue l'étanchéité des fermenteurs. (Bull. Alan T. et al. Biotechnologie: Tendances et perspectives internationales. OCDE 1982).

Comme les fuites de microorganismes seront presque inévitables, la nature encore inconnue du risque dépendra des caractéristiques des microorganismes utilisés.

Outre les fuites, il faut aussi considérer le risque de mutation et celui de la contamination des cultures par d'autres types de microorganismes, ce qui pourrait donner naissance à des populations microbiennes contaminantes inconnues.

1.1.2 Utilisation de microorganismes modifiés

À la lumière de ce qui précède, il est fort possible que des microorganismes nouveaux issus de manipulations génétiques se multiplient hors des zones de confinement physique. Les microorganismes pourraient alors contaminer le milieu de travail et engendrer par exemple:

1. des infections nouvelles;
2. la colonisation des travailleurs et la transmission de propriétés nouvelles à la flore bactérienne des travailleurs. Citons, entre autres, la résistance aux antibiotiques (Newman, 1984), un pouvoir cellulolytique et la capacité de synthétiser des protéines similaires à celles de l'homme, ce qui dans ce dernier cas, pourrait entraîner des maladies auto-immunes (Newman, 1982).

Les microorganismes habituellement utilisés en biotechnologie n'ont encore jamais causé d'infections graves chez les personnes qui les manipulent (Landrigan, 1982). Si l'on en juge d'après les connaissances actuelles, les risques associés à l'utilisation de microorganismes nouveaux seront, selon les probabilités, peu élevés (Landrigan, 1982). En effet, ces organismes recombinés

sont très fragiles et leur reproduction est peu probable en dehors de leur milieu de culture spécifique. Cependant, la recherche et l'utilisation de microorganismes plus résistants, dans le but de maximiser la production, augmenteront les chances de survie hors des zones de confinement dans le milieu de travail. Par voie de conséquence, les risques d'infection seront eux aussi augmentés.

1.1.3 Utilisation de microorganismes pathogènes

Disons tout de suite que les microorganismes habituellement utilisés en biotechnologie sont, pour la plupart, non pathogènes (Russell, 1983). Toutefois, certains d'entre eux tel le Pseudomonas sont des microorganismes dits opportunistes et pourraient de ce fait constituer un risque d'infection en milieu de travail. Quant aux pathogènes véritables, leur utilisation a été limitée jusqu'ici à la fabrication de vaccins qui se pratique suivant des méthodes de confinement efficaces. La manipulation d'organismes pathogènes n'est donc pas chose nouvelle; il s'agit d'adapter des techniques aseptiques déjà connues dans ce domaine à la fermentation de très grandes populations de microorganismes.

Néanmoins, un risque demeure: celui de la contamination par des bactéries modifiées dont le pouvoir pathogène ou toxigène serait inconnu. En effet, il est possible que des chercheurs produisent accidentellement, au cours de manipulations génétiques, des microorganismes qui soient analogues, par exemple, au bacille de la diphtérie

ou au vibrion du choléra, des microorganismes dont l'ADN soit cancérogène (Newman, 1982).

Même si l'on demeure conscient du risque d'infection, il importe de noter que l'humanité a appris à combattre efficacement contre celui-ci. En effet, la lutte de l'homme contre les épidémies remonte à l'Antiquité et depuis les découvertes révolutionnaires de Pasteur, elle repose sur des bases scientifiques solides. La recherche sur les maladies infectieuses, qui a mené à l'amélioration des techniques aseptiques, à la découverte et à l'utilisation des vaccins et des antibiotiques, a remporté de grandes victoires, notamment l'éradication de la variole. Nous pouvons donc continuer à compter sur son apport pour contrer les risques d'infection qui pourraient provenir des biotechnologies.

Par ailleurs, il faut signaler qu'il existe déjà des règles de sécurité pour protéger le personnel des industries biologiques et que ces règles sont souvent l'objet de révisions permettant d'améliorer la sécurité des biotechnologies. Il s'agit entre autres de mesures de confinement physique et biologique. Dans le premier cas, il est d'abord question de mesures de confinement primaire qui visent l'équipement contenant les microorganismes ou les cellules (les enceintes de confinement et les fermenteurs) et dont voici quelques exemples:

- à l'intérieur du fermenteur, le maintien de la pression au-dessus du milieu de culture à une valeur qui ne compromet pas l'étanchéité de l'appareil (RECD, 1983);

- l'emploi de solutions antiseptiques dans les joints de l'appareil de confinement, de barrières stériles sur les ouvertures des conduits (Russell, 1983).

- la stérilisation de l'air sortant de l'appareil de confinement (Russell, 1983).

Quant aux mesures de confinement secondaire, celles-ci touchent l'environnement immédiat des enceintes de confinement et des fermenteurs. Il s'agit, par exemple, du maintien d'une pression négative et de la filtration de l'air dans l'environnement immédiat de ces appareils par rapport au reste des installations (Russell, 1983).

Le confinement biologique, qui consiste à produire par recombinaison génétique des microorganismes ayant peu de chances de survie hors de leur milieu de culture spécifique, permet lui aussi d'améliorer la sécurité des procédés biologiques (Landrigan, 1982).

Le confinement biologique pourrait être obtenu en modifiant des microorganismes de façon à ce que, par exemple, ceux-ci ne puissent dégrader qu'un type particulier de substrat ou encore qu'ils ne puissent survivre que dans des limites très étroites de température (Miller, 1984).

1.2 Procédés biologiques et industrie chimique

Les risques reliés à l'utilisation de microorganismes vivants sont les plus importants que comportent les procédés biologiques et ils sont de plus spécifiques à ces derniers. Une attention particulière leur a donc été réservée. Voici maintenant un

bref aperçu des risques qui sont communs aux biotechnologies et à l'industrie chimique. Ces risques découlent de la préparation des substrats (sur lesquels vont croître les microorganismes) et des étapes d'extraction et de purification (qui servent à isoler le produit) (Russell, 1983). Suivant les étapes de production, les procédés comportent diverses opérations telles la distillation ou l'extraction par solvant et nécessitent l'emploi de solvants (phénol, benzène, chloroforme, toluène), de tampons (hydroxyde de sodium, urée) et d'antibiotiques (ampicilline, chloramphénicol, tétracycline) (Landrigan, 1982). L'utilisation des antibiotiques dans les fermentations constitue un risque qui existe déjà dans l'industrie pharmaceutique et l'industrie agro-alimentaire et qui consiste surtout en réactions d'hypersensibilité et dans l'émergence de résistance aux antibiotiques. Des mesures de sécurité généralement bien définies correspondent aux risques découlant des opérations précitées puisque ces dernières existent déjà dans l'industrie chimique. Il importe d'ajouter que les procédés biologiques requièrent des conditions d'opération moins dangereuses que les procédés de l'industrie chimique. Les premiers s'effectuent en solution très diluée, à pH modéré et à des températures voisines de la température ambiante, tandis que les deuxièmes nécessitent en général l'emploi de substances caustiques ou inflammables, des températures et des pressions élevées et comportent en outre des risques d'explosion ou de réaction exothermique forte (Russell, 1983).

1.3 Produits et sous-produits des biotechnologies

1.3.1 Produits des fermentations

Les produits des fermentations sont soit les microorganismes eux-mêmes, soit des substances synthétisées par

ces microorganismes (Russell, 1983). Dans ce dernier cas, il peut s'agir de produits biologiquement actifs telles l'insuline ou les pénicillines. Les risques qui découlent de l'exposition à ces substances en milieu de travail dépendent des propriétés pharmaco-toxicologiques de celles-ci; les pénicillines, par exemple, induiront des réactions d'hypersensibilité (Russell, 1983). Ces propriétés ne sont pas différentes de celles du même produit obtenu par catalyse chimique et sont évaluées suivant les protocoles établis pour l'industrie chimique et l'industrie pharmaceutique: méthodes physico-chimiques, biologiques, études toxicologiques.

1.3.2 Sous-produits des fermentations

Les procédés de fermentation engendrent nombre de substances inutilisées ou "indésirables" - métabolites, toxines, protéines et débris cellulaires microbiens - qui viennent contaminer le produit recherché. Leur présence au moment de l'extraction pourrait peut-être avoir des conséquences pour les personnes qui y seraient exposées; on peut songer ici au pouvoir allergène probable de différents peptides microbiens (Landrigan, 1982). On connaît en fait très peu de choses sur l'activité biologique de ces sous-produits; certains d'entre eux pourraient posséder un pouvoir toxigène insoupçonné.

Il importe de préciser ici que les risques n'existent pas seulement pour les travailleurs des industries biologiques. Si l'on prend, par exemple, les médicaments

obtenus par un procédé biologique, il faut songer qu'un produit dont la purification serait incomplète pourrait causer des préjudices au malade auquel il serait administré. Cette éventualité pose tout le problème actuel de la purification des produits obtenus par les techniques biologiques et de leur évaluation pharmaco-toxicologique.

À la lumière des connaissances actuelles, il semble que les risques découlant de l'exposition aux sous-produits des fermentations soient moins grands que ceux qui sont reliés à la manipulation des microorganismes eux-mêmes (Russell, 1983); cependant, ces risques existent et il faut envisager des mesures de sécurité à cet effet. Les sous-produits devraient donc être soumis à une évaluation de leur activité biologique générale par des études toxicologiques appropriées (MARO, 1983). Comme dans l'industrie pharmaceutique, ils devraient faire l'objet de précautions assurant la sécurité de leur manipulation: mentionnons le confinement physique des sous-produits, la ventilation adéquate des lieux de travail et l'observation rigoureuse de modes opératoires stricts. La surveillance médicale des travailleurs, sous forme d'examens périodiques, peut aider à déceler les premiers symptômes de maladies professionnelles (Landrigan, 1982). Parallèlement, la possibilité de contamination du produit recherché par des protéines microbiennes, des particules virales, des acides nucléiques ou des toxines va nécessiter le perfectionnement des méthodes de purification et d'élimination des contaminants en cours de production (MARO, 1983).

1.4 Cultures de cellules

Depuis plusieurs années, les cultures de cellules servent de substrat à la multiplication et à la croissance de parasites intracellulaires dans la production de vaccins. La technique est bien connue de ceux qui la pratiquent et ne comporte que peu de dangers compte tenu des règles de sécurité qu'il faut observer dans la manipulation de ces cellules. Pour sa part, la culture d'hybridomes - lignées cellulaires obtenues par la fusion de deux cellules de génome différent dans le but, par exemple, de produire des anticorps - constitue une application nouvelle de la technique des cultures de cellules (MARO, 1983).

Parce que les cellules issues de la fusion cellulaire ou de la recombinaison de l'ADN possèdent un génome différent de celui des cellules de départ, on considère que les risques reliés à la manipulation de ces lignées cellulaires issues de recombinaisons génétiques sont de même nature que les risques qui découlent de la manipulation de cellules contenant des gènes potentiellement dangereux (gènes oncogènes, virus latents, gènes codant des substances nocives pour l'homme et l'environnement). Toutefois, l'application des techniques microbiologiques et l'observation de règles de sécurité limitent les risques aux individus qui manipulent ces cultures de cellules en laboratoire.

Il semble enfin que les risques liés à l'utilisation de cultures de cellules, modifiées ou non, soient moindres que ceux qui découlent de l'emploi de grandes quantités de microorganismes dans les fermenteurs parce que:

1. les niveaux de confinement physique requis pour préserver l'intégrité des cellules sont très stricts;

2. les cellules en question sont très fragiles;

3. les risques ne concernent que les travailleurs qui manipulent ces cultures de cellules en laboratoire.

Cependant, il apparaît important de procéder à l'analyse des produits de synthèse de toute nouvelle lignée cellulaire porteuse de virus ou de toute nouvelle lignée d'hybridomes, dans le but de découvrir si certaines de ces substances sont dotées d'un pouvoir toxigène.

Chapitre II

2.0 Les risques pour l'environnement

Les biotechnologies comportent des risques non seulement pour les travailleurs des bio-industries, mais aussi pour l'environnement. Ici, les risques proviennent de deux principaux facteurs: 1. de la masse des déchets et des sous-produits organiques et minéraux issus de ces technologies; 2. de l'exploitation de microorganismes vivants comme agents de synthèse de substances variées et comme agents de modification de la matière vivante ou inanimée, dans un processus ayant lieu en milieu fermé (fermenteur) ou ouvert (environnement).

2.1 Déchets industriels et sous-produits

2.1.1 Microorganismes

La contamination répétée de l'environnement par des microorganismes vivants connus ou inconnus, des métabolites microbiens ou des débris cellulaires, que ce soit sous forme d'aérosols denses ou par les eaux d'égout, comporte les mêmes risques que la contamination du milieu de travail.

Voici donc un simple rappel de ces risques:

1. la colonisation d'êtres vivants par des microorganismes étrangers à la flore de l'hôte, les conséquences dépendant des propriétés des microorganismes en cause;

2. la sensibilisation à certaines protéines microbiennes entraînant des maladies auto-immunes;

3. l'exposition à des peptides ou des métabolites dont le pouvoir pathogène, toxicogène ou immunogène est inconnu.

Il s'agit maintenant de voir quelles sont, hors du fermenteur, les chances de survie des microorganismes modifiés par recombinaison génétique. Comme il a été mentionné au premier chapitre, les microorganismes recombinés actuellement utilisés en biotechnologie sont généralement incapables de survivre longtemps hors de conditions physico-chimiques bien contrôlées; cependant, l'utilisation probable, dans l'avenir, de microorganismes moins fragiles - dans le but d'améliorer les procédés industriels - pourrait augmenter les chances de survie de ces microorganismes dans un environnement naturel. Pour qu'un microorganisme modifié par recombinaison génétique présente un danger après sa libération dans l'environnement, il faudrait: 1. qu'il soit vivant au moment où il passe dans l'environnement; 2. qu'il puisse maintenir ses fonctions vitales ou transmettre l'information génétique acquise par recombinaison "in vitro" à des microorganismes présents dans son nouveau milieu; 3. que le produit codé par son ADN recombiné soit néfaste pour un autre être vivant, qu'il puisse altérer une substance essentielle à la survie, ou encore qu'il puisse modifier une substance possédant une certaine valeur sur le plan économique.

Nous nous permettons de souligner que des études ont démontré que certaines souches d'E. coli modifiées par

recombinaison génétique peuvent survivre dans des eaux d'égout suffisamment longtemps pour pouvoir transmettre leur facteur d'antibiorésistance acquise aux micro-organismes du milieu (Newman, 1982). Les microorganismes recombinés libérés sous forme d'aérosol ou jetés dans les égouts (parce qu'ils sont devenus des déchets industriels) sont susceptibles de coloniser des niches écologiques, de s'y multiplier et de transmettre leur nouveau gène à des espèces microbiennes du milieu, ce qui donnerait le jour à des espèces dotées de caractéristiques nouvelles, nocives peut-être pour d'autres êtres vivants. La colonisation du tube digestif des animaux par des coliformes cellulolytiques responsables d'une dégradation indésirable des fibres alimentaires en est un exemple. Citons également le cas de maladies auto-immunes causées par l'émergence dans l'intestin de populations microbiennes possédant les gènes d'expression de protéines animales ou d'analogues de ces protéines.

Ainsi, un microorganisme sans danger dans l'environnement pour lequel il a été modifié - le fermenteur - peut devenir dangereux s'il colonise accidentellement une niche écologique où son activité entraînera un déséquilibre de l'écosystème.

Plusieurs mesures de sécurité peuvent être proposées dans le but de réduire les risques que comporte pour l'environnement l'utilisation de microorganismes dans les procédés biologiques. Il serait approprié

1. de contrôler l'intégrité des populations microbiennes utilisées;

2. d'étudier et de prévoir les effets qu'aurait éventuellement sur l'environnement la libération massive d'un nouveau microorganisme capable de survivre hors des zones de confinement avant de l'utiliser dans des fermenteurs;

3. de chercher à limiter la formation d'aérosols denses;

4. de surveiller l'apparition ou la recrudescence de toute maladie auto-immune chez les travailleurs et parmi la population résidant aux abords des bio-industries.

2.1.2 Antibiotiques

Dans les procédés biologiques, l'utilisation d'antibiotiques sur une grande échelle pourrait poser des problèmes d'ordre écologique. On sait que l'emploi des antibiotiques dans l'industrie agro-alimentaire a favorisé l'émergence d'antibiorésistance chez les animaux. Cette propriété microbienne a ensuite été transmise à la flore de l'homme et constitue aujourd'hui un problème de santé publique important (Holmberg, 1984). Le rejet d'antibiotiques dans l'environnement pourrait entraîner les mêmes conséquences dans d'autres niches écologiques.

Afin d'améliorer la sécurité de l'utilisation des antibiotiques dans les procédés biologiques, il faudrait prévenir la libération de tout antibiotique actif, sous forme d'aérosol dense ou de déchet, pendant et après les étapes de production.

Il serait prudent d'évaluer périodiquement le degré de résistance aux antibiotiques de la microflore des travailleurs et de la population aux environs des industries, et le degré d'hypersensibilité aux antibiotiques chez ces mêmes individus. Toute augmentation d'un de ces symptômes pourrait signifier, à long terme, des problèmes de santé. Des études sur les effets de la libération localisée (aérosol) ou étendue (accident) d'antibiotiques aux abords des bio-industries aideraient à déterminer l'influence de ces substances sur la faune et la flore symbiotes des microorganismes susceptibles d'être la cible des antibiotiques.

2.1.3 Produits chimiques et sous-produits organiques

Comme nous l'avons dit au chapitre précédent, les procédés biologiques nécessitent l'emploi de solvants et de réactifs. Les risques associés à l'élimination de ces substances découlent entre autres, de la masse de déchets (actifs ou non) que constituent celles-ci: la surcharge des égouts au moment de l'élimination de ces substances pourrait provoquer des modifications brutales des conditions environnementales.

Chaque industrie constitue un cas particulier, il faudra connaître pour chacun: 1. les substances qui sont rejetées dans l'environnement, leur concentration et le volume déversé, les interactions possibles entre ces substances (risque de diauxie, c.-à-d. la dégradation préférentielle par un microorganisme d'une substance par rapport à une autre (Atlas, 1980)); 2. leur sensi-

bilité à l'action minéralisante des microorganismes (Alexander, 1980) et la capacité du milieu en général de les altérer; 3. les sous-produits de la dégradation microbienne de ces substances et la toxicité de ceux-ci par rapport à la substance mère, citons le cas des nitrites précurseurs des nitrosamines (Alexander, 1980); 4. il faudra identifier les cibles du pouvoir toxigène de ces substances si elles en possèdent un; 5. il faudra déterminer si les conditions physico-chimiques de l'environnement influent sur la dégradation microbienne de ces substances.

Ces informations seront nécessaires pour déterminer le mode de traitement des déchets bruts le plus approprié et pour établir le procédé d'élimination des résidus qui, à long terme, aura le moins de conséquences pour l'environnement au site d'élimination des déchets.

2.2 Microorganismes vivants utilisés comme agents d'un processus ayant lieu en milieu ouvert

En milieu ouvert, c'est-à-dire dans l'environnement, les risques reliés à l'utilisation des microorganismes vivants proviennent, comme en milieu fermé:

1. de l'introduction dans le milieu de microorganismes nouveaux modifiés par recombinaison génétique;

2. de l'utilisation de grandes populations de microorganismes;

3. de l'utilisation de microorganismes pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes.

Actuellement, on se sert de microorganismes en milieu ouvert:

1. dans des procédés de dépollution: la détoxication des déchets industriels et le traitement des eaux usées;

2. dans la lixiviation des métaux;

3. en agriculture;

4. dans la lutte contre les parasites.

2.2.1 Dépollution microbiologique: détoxication des déchets industriels et traitement des eaux usées

Les microorganismes, s'ils sont sensibles à l'action de certaines substances, sont à leur tour capables de modifier, de transformer, par voie enzymatique, des substances organiques ou minérales polluantes qui se retrouvent dans les effluents urbains et industriels. Les risques liés à cette propriété des microorganismes découlent de la possibilité pour ces derniers de transformer des substances présentes dans l'environnement en sous-produits (dégradation incomplète, dérivé) plus toxiques ou plus stables que la substance qui a été soumise à leur action. Quatre types de sous-produits indésirables peuvent résulter d'un tel processus (Alexander, 1980):

1. un sous-produit plus toxique que la substance mère;

2. un sous-produit ayant une action toxique sur une cible biologique, connue ou inconnue, autre que la cible pour laquelle avait été entreprise la détoxication;

3. un sous-produit toxique peu ou non dégradable persistant très longtemps dans l'environnement;

4. un sous-produit toxique pouvant s'accumuler dans des êtres vivants: celui-ci présente un risque si, à long terme, il menace de faire disparaître un ou plusieurs chaînons d'une chaîne alimentaire faisant partie d'un écosystème donné.

Il faudrait acquérir une connaissance précise du processus de dégradation d'un produit ou d'un ensemble de produits (traitement concomitant) (Alexander, 1980), du ou des microorganismes qui participent à cette dégradation (cométabolisation) (Alexander, 1980), des sous-produits engendrés et du rythme de cette dégradation avant de recourir à un procédé de dépollution microbiologique. Ceci permettrait 1. de sélectionner les microorganismes les plus performants sur un substrat donné; 2. de contrôler le processus de dégradation et les sous-produits qui en résulteraient afin de limiter le plus possible les effets que ces substances seraient susceptibles de produire.

L'utilisation de microorganismes dans le traitement des eaux usées comporte les mêmes risques que l'emploi de microorganismes dans l'élimination ou la détoxication de déchets industriels. Cependant, le processus de dépollution de l'eau a lieu en milieu ouvert et non en milieu fermé ou semi-fermé (lagunes de détoxication); conséquemment, les risques de contamination microbienne de l'environnement viennent s'ajouter aux risques énumérés plus haut dans cette section. On retrouve donc ici les risques et les mesures de sécurité énumérés à la section 2.1.1.

2.2.2 Lixiviation des métaux

L'industrie minière exploite la capacité de certains microorganismes d'extraire un métal d'un minerai.

Cette extraction biologique des métaux se fait soit directement, par réaction enzymatique au moment de la production d'ATP par les microorganismes impliqués, soit de façon indirecte par la production d'un intermédiaire fortement oxydant (ions ferriques) qui, lui, attaquera les métaux et les solubilisera (Brierley, 1982). Les métaux ainsi solubilisés sont recueillis par ruissellement et sont entreposés jusqu'à ce qu'ils soient soumis à une dernière extraction, chimique cette fois, ayant pour but de purifier les métaux en question. À l'heure actuelle, on a recours à la biolixiviation pour récupérer du cuivre et de l'uranium de minerai contenant une faible quantité de ces métaux (Brierley, 1982).

Comme ce procédé s'effectue à ciel ouvert, il est influencé par les conditions climatiques et demeure sujet à une contamination externe. La lixiviation des métaux en fermenteur n'est pas encore chose réalisable car on ne connaît pas toutes les conditions physico-chimiques nécessaires au métabolisme microbien ni les détails du processus d'extraction. Ce dernier peut requérir une coopération entre certains microorganismes, à preuve celle qu'on retrouve entre le Leptospirillium ferrooxidans et le Thiobacillus organoparus dans la dégradation de la chalcopyrite (Brierley, 1982). Cependant, les modalités de ces interactions microbiennes n'ont pas encore été élucidées.

Les microorganismes qui servent à lixivier les métaux sont, à l'état naturel, présents dans le sol; ils deviennent les espèces dominantes en nombre dans leur milieu par suite d'une modification artificielle des conditions physico-chimiques telluriques (pH acide, oxygénation). Ces microorganismes ne sont le fruit d'aucune manipulation génétique et compte tenu actuellement du manque de connaissances dans le domaine de la biolixiviation, il est peu probable que, dans un avenir rapproché, on crée en laboratoire de nouvelles souches plus performantes.

L'extraction biologique des métaux a moins d'effets nocifs sur l'environnement que les procédés miniers traditionnels, car elle n'entraîne pas de dégagement de gaz ou de chaleur; c'est un procédé qui s'effectue lentement, sur des sites très circonscrits et qui requiert peu d'énergie. En outre, les microorganismes utilisés se trouvent à l'état naturel sur les sites d'extraction. Cependant, certains microorganismes actuellement absents des sites miniers se sont montrés capables d'y proliférer. Ces espèces, dont le Sulfolobus acidocaldarius et le Pseudomonas aeruginosa, pourraient présenter un risque pour l'environnement si, après avoir contaminé les sites d'extraction, elles devenaient les espèces les plus importantes en nombre. Parce que ces microorganismes peuvent accumuler de grandes quantités de métaux toxiques comme le molybdène ou l'uranium, leur prolifération sur un site minier pourrait, à long terme, entraîner la formation de poches telluriques dont les fortes concentrations en métaux toxiques seraient dommageables pour l'environnement immédiat.

À l'heure actuelle, l'extraction biologique des métaux ne présente pas de risques importants. La surveillance des populations microbiennes présentes sur les sites d'extraction et le contrôle de la composition du sol sont les seules mesures de sécurité auxquelles on puisse penser pour le moment. Toutefois, il serait utile de mieux connaître la physiologie des microorganismes en question et les interactions microbiennes nécessaires au processus de la lixiviation pour être en mesure de mieux évaluer l'impact de ce procédé sur l'environnement.

2.2.3 Agriculture

L'utilisation massive de microorganismes vivants en agriculture se limite actuellement à l'ensemencement des champs avec des microorganismes du genre Rhizobium, dans le but d'augmenter la fixation de l'azote et d'accroître ainsi la production de légumineuses (Brill, 1981). On envisage aussi d'utiliser d'autres microorganismes tels Frankia alni pour augmenter la fixation de l'azote chez les peupliers, Pisolithus tinctorius pour accroître le pouvoir d'absorption des racines du pin et Pseudomonas aeruginosa pour augmenter la résistance au froid des pommes de terre.

On ne connaît pas les interactions ni les échanges qui ont lieu entre les microorganismes vivant à l'état naturel dans un milieu donné et ceux qu'on y implante artificiellement. On ne sait pas non plus si l'amélioration de certaines espèces de plantes pourrait entraîner un déséquilibre dans l'écosystème dont ces plantes font partie.

L'application de procédés biologiques en agriculture ne semble pas présenter de grands risques pour l'homme et les animaux, mais des études seront nécessaires pour déterminer l'influence des microorganismes utilisés comme agents fertilisants sur la flore, la faune et les microorganismes des niches écologiques où sont appliqués ces procédés.

2.2.4 Lutte contre les parasites

Face aux effets nocifs de certains pesticides chimiques, les chercheurs ont étudié la possibilité d'utiliser des microorganismes comme pesticides: mentionnons par exemple l'emploi de Bacillus thurigiensis dans la lutte contre les chenilles défoliantes.

L'emploi de pesticides biologiques n'est pas cependant sans présenter certains risques. En effet, certains microorganismes employés comme pesticides pourraient poser des problèmes d'ordre écologique si leur spectre d'action était trop large ou mal connu. Il y aurait alors risque 1. de détruire des populations microbiennes, animales ou végétales autres que celles auxquelles on voulait s'attaquer; 2. de compromettre l'équilibre de l'écosystème là où on aurait répandu des pesticides biologiques.

Avant d'utiliser des quantités massives de microorganismes comme pesticides, il faudra mener des études-pilotes afin de déterminer: 1. quels êtres vivants ces microorganismes peuvent coloniser, 2. quels sont les effets de cette colonisation microbienne, 3. quelle est la

persistance de cette dernière; 4. quels sont les effets à long terme de l'épandage de pesticides biologiques.

En général, les risques que présentent les biotechnologies pour l'environnement sont moins bien connus que les risques d'infection et d'intoxication déjà définis pour l'homme. C'est pourquoi des études devront être entreprises afin de mieux identifier ces risques. Il importe aussi de préciser que les accidents qui peuvent survenir dans l'environnement ne se produisent pas de façon très brutale de sorte que cela permet d'analyser la situation et de chercher des solutions.

Chapitre III

3.0 Les avenues de recherche

La sécurité des biotechnologies requiert la connaissance des processus en cause et l'élaboration d'une réglementation et de directives adéquates. Cependant, comme on a pu le constater, les biotechnologies comportent des risques qui sont plus ou moins bien définis: de nombreuses avenues de recherche s'ouvrent donc dans ce domaine.

Le présent chapitre reprend, à peu de choses près, les avenues de recherche présentées aux chapitres I et II (plusieurs d'entre elles ayant déjà été l'objet des préoccupations du N.I.H.) puis présente des domaines de recherche et des mesures de sécurité qui, croyons-nous, devraient constituer à l'heure actuelle des priorités pour les laboratoires de recherche et les industries ayant recours aux techniques biologiques de pointe. En annexe, on retrouve sous une autre forme une liste des questions que soulèvent la manipulation et la libération dans l'environnement de microorganismes modifiés par recombinaison génétique (Rissler, 1984).

3.1 Milieu de travail

3.1.1 Utilisation des microorganismes:

a) Conception de méthodes plus efficaces de confinement physique des microorganismes:

- méthodes de confinement primaire (enceinte de confinement, fermenteur);

- méthodes de confinement secondaire (aseptisation de la zone environnant l'appareillage de confinement primaire).

b) Création de nouvelles méthodes de confinement biologique: arriver à produire des microorganismes dont les chances de survie en dehors de leur milieu de culture soient de plus en plus limitées.

c) Élaboration de programmes de surveillance médicale des travailleurs pour le dépistage précoce des maladies professionnelles, c'est-à-dire:

- l'hypersensibilité à des antibiotiques ou à d'autres substances;

- la résistance aux antibiotiques;

- les maladies auto-immunes;

- la colonisation par des microorganismes.

d) Étude des microorganismes utilisés en biotechnologie, de leurs propriétés et de leur génome. Il importe de signaler que ce type d'étude devrait constituer une avenue de recherche dans tous les domaines de la biotechnologie afin d'améliorer la sécurité des procédés et d'assurer la qualité du produit recherché.

3.1.2 <u>Produits et sous-produits des fermentations</u>:

a) Évaluation de l'activité biologique des sous-produits des fermentations.

b) Élaboration de méthodes de dépistage des effets des produits et des sous-produits des fermentations chez les travailleurs.

c) Élaboration de méthodes de purification des produits des fermentations (détection des toxines, des pyrogènes, etc.).

d) Élaboration de méthodes de destruction des micro-organismes en cours de production.

3.1.3 Cultures de cellules

Élaboration de méthodes d'analyse des propriétés et de l'activité biologique des substances synthétisées par les hybridomes et par les cellules porteuses de virus.

En résumé, la recherche sur la sécurité des biotechnologies en milieu de travail a pour but d'améliorer les techniques de confinement des microorganismes utilisés et des produits de ces derniers, ainsi que la détection des maladies professionnelles.

3.2 Environnement

3.2.1 Déchets industriels et sous-produits des biotechnologies

Microorganismes

a) Élaboration de méthodes de contrôle de l'intégrité des populations microbiennes utilisées.

b) Étude et prévision des effets de la libération massive dans l'environnement des microorganismes utilisés en fermenteur.

c) Mise au point de techniques limitant la libération d'aérosols denses de microorganismes.

d) Elaboration de programmes de surveillance médicale des travailleurs et des individus résidant aux alentours des industries biotechnologiques (voir 3.1.1 c).

Antibiotiques

a) Mise au point de techniques limitant la libération d'aérosols d'antibiotiques actifs et permettant un pré-traitement des antibiotiques avant leur déversement dans les égouts.

b) Élaboration de programmes de surveillance médicale pour évaluer les effets des antibiotiques chez les individus résidant aux alentours des industries biotechnologiques (voir 3.1.1 c).

Sous-produits

a) Etude des produits chimiques utilisés dans les procédés biologiques et des sous-produits engendrés par ces procédés:

- Déterminer si ces substances peuvent être l'objet de l'action minéralisante des micro-organismes;

- si elles peuvent être altérées par le milieu;

- identifier les sous-produits de leur dégradation ou de leur métabolisation par les microorganismes présents dans l'environnement;

- déterminer si elles possèdent un pouvoir toxique et, le cas échéant, identifier les cibles de ce pouvoir toxique;

- évaluer l'influence des conditions physico-chimiques sur leur dégradation microbiologique.

b) À l'aide des données obtenues en a), concevoir des procédés d'élimination qui soient le moins dommageables possible pour l'environnement.

c) Élaboration de méthodes de détoxication basées sur l'emploi de microorganismes.

3.2.2 Détoxication des déchets industriels et traitement des eaux usées:

a) Étude des processus de dégradation, par les micro-organismes, de substances éliminées en tant que déchets.

b) Mise au point de meilleures méthodes de traitement des eaux usées.

3.2.3 Lixiviation des métaux:

L'élaboration de programmes de contrôle des populations microbiennes et des variations de la composition du sol sur les sites d'extraction constituent des domaines de recherche importants en matière de biosécurité.

3.2.4 Agriculture:

Étude des interactions entre les microorganismes issus du génie génétique et les microorganismes indigènes, la faune et la flore des niches écologiques où sont appliqués des procédés agricoles biologiques.

3.2.5 Lutte contre les parasites:

a) Études-pilotes permettant de déterminer quels êtres vivants sont colonisés par les microorganismes utilisés dans les procédés biotechnologiques.

b) Étude des effets de cette colonisation microbienne.

c) Détermination de la durée de cette colonisation.

d) Étude des effets à long terme de l'épandage de pesticides biologiques pour l'environnement.

Les buts de la recherche qui s'ouvre dans le domaine de la sécurité des biotechnologies pour l'environnement peuvent se résumer comme suit:

- prévoir les effets de la libération dans l'environnement de microorganismes et des déchets engendrés par les procédés biologiques en milieu fermé;

- prévenir la libération de microorganismes ou de produits dangereux dans le milieu environnant;

- améliorer les procédés de détoxication;

- prévoir les effets de l'utilisation de microorganismes en milieu ouvert (agriculture, lixiviation des métaux, dépollution, lutte contre les parasites) pour l'homme, la faune et la flore et les microorganismes là où sont appliqués des procédés biologiques.

Comme on peut le constater, la sécurité des biotechnologies en milieu de travail et pour l'environnement offre de nombreux sujets de recherche.

3.2.6 Priorités

Les auteurs ont voulu, pour leur part, définir certaines priorités en la matière.

En milieu de travail, il s'agit de mettre au point des méthodes de diagnostic précoces pour les travailleurs:

1. des protocoles de surveillance de la qualité du milieu de travail;

2. des protocoles de surveillance médicale comportant des examens et des analyses périodiques comme, par exemple, en immunologie:

   - des méthodes de détection des allergènes (enzymes, débris cellulaires);
   - des méthodes de détection des réactions allergiques (cutiréaction, etc.);

- des méthodes de détection précoce des maladies auto-immunes.

3- Pour l'environnement, il s'agit de mettre au point des méthodes de détection de microorganismes déversés dans le milieu de façon volontaire ou accidentelle:

- des méthodes de détection rapide des fuites et de la dissémination de microorganismes dans le milieu basées sur l'utilisation d'indicateurs inoffensifs:

- des méthodes permettant de déterminer le "patron microbien" dans l'environnement des bio-industries; il s'agit ici de créer des techniques d'échantillonnage et d'identification des microorganismes présents dans le milieu par suite de l'implantation de ces industries;

- des méthodes de contrôle de la transmission, à la microflore de l'homme et des animaux, de propriétés microbiennes telle l'antibiorésistance.

Chapitre IV

4.0 Les directives et la réglementation

4.1 Canada

Les premières directives canadiennes concernant la sécurité des expériences de génie génétique ont été publiées en 1978 par le Conseil de recherches médicales. Une seconde édition paraissait en 1980 (CRM.1980).

Ces directives ont la particularité de porter non seulement sur la recombinaison de l'ADN, mais également sur les cultures de cellules et de virus animaux. Cependant, il y a un manque de directives sur la manipulation des bactéries pathogènes.

Les directives du C.R.M. concernent surtout le travail en laboratoire. Quant aux grandes quantités de culture, le guide se contente de souligner que les risques augmentent selon la quantité ou la concentration de microorganismes utilisée, sans donner plus d'indications sur ce sujet.

La première section du guide définit les niveaux de confinement physique canadiens qui sont au nombre de six: du niveau A, le plus faible, au niveau F, le plus strict. Voici, tiré des Directives, un tableau comparatif des niveaux de confinement physique canadiens, américains et britanniques.

Canada (C.R.M.)	États-Unis (N.I.H.)	Angleterre
A	P1	-
B	P2	I
C	P2 à P3	II
D	P3 à P4	II à III
E	P3 à P4	III
F	P4	IV

(C.R.M., 1980)

La deuxième section du guide présente les exigences de confinement pour les manipulations génétiques, les expériences de virologie.

Examinons brièvement les règles de sécurité relatives au génie génétique. Certaines expériences telles l'autoclonage ou la recombinaison d'ADN in vitro ne sont soumises à aucune réglementation. À l'opposé, d'autres types d'expériences nécessitent l'autorisation du Comité de biosécurité du C.R.M., en plus de l'observation de directives strictes: il s'agit entre autres du clonage de gènes de virus exigeant un niveau de confinement physique E ou F; d'expériences sur une grande échelle pratiquées sur des organismes contenant de l'ADN recombiné, si cet ADN est bien caractérisé et ne contient aucun gène de virulence; de la libération dans l'environnement de microorganismes contenant de l'ADN produit par recombinaison. Le guide traite aussi des cas intermédiaires auxquels s'appliquent les niveaux de confinement A et B; il spécifie en outre qu'avant de commencer toute expérience qui requiert un niveau de confinement supérieur à B, il faut d'abord obtenir l'autorisation du Comité de biosécurité du C.R.M. Il est à noter que le confinement physique

peut être abaissé par le recours au confinement biologique. Ce dernier comprend quatre niveaux différents: faible, modéré, élevé et très élevé.

Il importe de mentionner que les laboratoires de recherche et les universités se conforment aux Directives du C.R.M. et qu'il existe des comités locaux de biosécurité bien structurés dans ces établissements.

Par ailleurs, outre le C.R.M., il existe d'autres organismes qui s'occupent de la sécurité des biotechnologies. En effet, la Division de la biosécurité du Bureau de lutte anti-infectieuse de la Direction générale de la protection de la santé a mis sur pied différents programmes touchant plusieurs aspects de la biosécurité: citons entre autres des services de consultation pour les laboratoires de microbiologie, d'évaluation des installations de confinement, un programme de sécurité au laboratoire et un service d'information sur les accidents et les cas d'infection dans les laboratoires.

D'autres organismes fédéraux se préoccupent de biosécurité:

- Ainsi, les ministères de l'Environnement et de l'Agriculture s'intéressent à l'impact des nouvelles technologies sur l'environnement et règlementent le déversement de substances potentiellement toxiques dans le milieu.

- Le Conseil des Sciences du Canada vient de publier un rapport dans lequel l'auteur, Sheldon Krimsky, définit clairement les problèmes que pose la réglementation des

biotechnologies par rapport aux structures administratives et législatives fédérales actuelles (Krimsky, 1984). L'auteur propose l'amendement des lois existantes de façon à satisfaire aux besoins créés par les biotechnologies en matière de réglementation.

- On peut s'attendre à ce que les ministères provinciaux du Travail, de l'Environnement et de l'Agriculture s'intéressent à la question de la sécurité des biotechnologies. Signalons que le Secrétariat à la Science et à la Technologie du Québec, qui est devenu le ministère de la Science et de la Technologie, a mis sur pied un programme intitulé À l'heure des biotechnologies. Ce programme prévoyait la création d'une mission ad hoc sur la biosécurité, laquelle a publié un rapport sur les réglementations en vigueur au Canada et dans différents pays (SST, 1982).

4.2 États-Unis

Les directives américaines (N.I.H., 1983) ne portent que sur la manipulation d'ADN produit par recombinaison génétique, contrairement aux directives canadiennes qui règlementent en plus la manipulation de cellules et de virus animaux. Publiée en 1976 par le N.I.H., la réglementation américaine a été assouplie au cours de révisions successives jusqu'à sa plus récente édition, en 1983. Au début, ces directives américaines

ne s'appliquaient qu'à la recherche subventionnée par le N.I.H., mais dès le mois de novembre 1976, tous les organismes fédéraux américains rendaient ces directives obligatoires pour tous les projets de recherche qu'ils subventionnaient.

La réglementation américaine établit quatre niveaux de confinement physique qui vont de P1, le plus faible, à P4, le plus strict (se reporter à la page 37 pour une comparaison avec les niveaux de confinement canadiens) et deux niveaux de confinement biologique: HV1 et HV2.

Il est possible de combiner confinement physique et biologique pour réduire le risque de dissémination accidentelle d'organismes porteurs d'ADN recombiné et de leurs vecteurs. Il faut préciser que tout système vecteur-hôte proposé comme moyen de confinement biologique doit être approuvé par le Recombinant DNA Advisory Committee (R.A.C.) du N.I.H., avant qu'on ne procède à des expériences en laboratoire.

Avec le début des applications industrielles du génie génétique, le N.I.H. créait un sous-comité au R.A.C. et lui donnait pour mandat d'évaluer les risques de l'utilisation sur une grande échelle de microorganismes contenant de l'ADN recombiné. Les travaux de ce sous-comité ont permis d'adapter les niveaux de confinement physique P1, P2 et P3 à la production industrielle (cultures de microorganismes modifiés par recombinaison génétique d'un volume supérieur à 10 litres). Ces niveaux de confinement sont appelés P1-LS (LS pour "large scale"), P2-LS et P3-LS.

En février 1984, le Committee on Science and Technology de la Chambre des Représentants des États-Unis publiait un rapport: The Environmental Implications of Genetic Engineering.

Selon ce rapport, la diffusion dans l'environnement d'organismes issus du génie génétique comporte peu de risques, mais des risques importants. Afin de préciser cette affirmation, considérons d'abord la séquence des événements par lesquels un microorganisme peut devenir dangereux pour l'homme et l'environnement: l'intégration d'un gène étranger dans l'ADN du microorganisme, la libération, la survie et la multiplication de celui-ci dans l'environnement, puis la contamination d'organismes vivants et les dommages qui peuvent en découler (Rissler, 1984). Comme la probabilité qu'un microorganisme nuise à d'autres êtres vivants résulte du produit de la probabilité de chacun des événements précités, il apparaît que les risques pour l'homme et l'environnement sont limités si la probabilité de chacun de ces événements est faible, ce qui semble l'hypothèse la plus vraisemblable à l'heure actuelle. Précisons qu'il ne s'agit pas ici de minimiser ou d'ignorer la gravité des conséquences d'un accident écologique éventuel.

Les auteurs de The Environmental Implications of Genetic Engineering sont d'avis que la réglementation actuelle ne permet pas un dépistage précoce non plus qu'une intervention rapide dans l'éventualité d'un accident qui surviendrait dans l'environnement; ils proposent donc que l'Environmental Protection Agency (E.P.A.) soit investie d'une juridiction sur tout ce qui touche la libération dans l'environnement d'organismes modifiés par manipulations génétiques et qui n'est pas déjà réglé par une loi. Pour donner suite aux recommandations du rapport, le N.I.H. créait en avril 1984 un groupe de travail sur la libération dans l'environnement d'organismes issus du génie génétique. Ce groupe est subordonné au R.A.C.

Cette brève analyse des directives américaines permet de se rendre compte du souci constant d'adapter les règles de sécurité aux situations nouvelles engendrées par les applications industrielles du génie génétique et d'autres techniques biologiques de pointe. Il va sans dire que cette adaptation continuelle aux réalités scientifiques et technologiques exige une recherche continuelle pour guider ceux qui ont la charge d'élaborer ces règles.

4.3 Grande-Bretagne

Les directives britanniques sur la sécurité des biotechnologies sont semblables à celles des États-Unis; par contre, elles ont été incluses dans une loi sur la santé et la sécurité du travail. De plus, tous les projets de recherche, tant dans l'industrie que dans les universités, doivent recevoir l'approbation de deux agences gouvernementales: Le Health and Safety Executive et le Genetic Manipulation Advisory Group. Comme au Canada et aux États-Unis, la responsabilité de l'application des directives incombe à des comités locaux de biosécurité.

4.4 France

La France, quant à elle, suit le modèle américain. Une Commission de la Délégation générale à la recherche scientifique et technique (D.G.R.S.T.) émet des directives auxquelles se conforment les organismes signataires d'une convention avec la D.G.R.S.T. ou les organismes subventionnés par cette dernière. Des comités locaux, pour leur part, voient à l'application des directives de la D.G.R.S.T.

Quant à nous, nous croyons qu'il serait souhaitable que la réglementation canadienne des biotechnologies soit fondée sur les lois existantes en matière de santé et de protection de l'environnement et surtout que l'encadrement s'appuie sur des directives qui, par leur nature non coercitive, pourraient faciliter l'évolution concomitante des connaissances des règles de sécurité et le développement des biotechnologies.

Chapitre V

5.0 Les craintes d'ordre socio-politique

Les craintes formulées au sujet des risques reliés aux biotechnologies proviennent surtout du monde scientifique et des milieux bien informés sur les questions d'actualité, car le grand public n'est pas encore au fait des développements des techniques biologiques de pointe (Rifkin, 1984).

Certains craignent que les biotechnologies ne deviennent une arme meurtrière entre les mains des puissances qui gouvernent la planète, c'est-à-dire la mise au point de bombes biologiques puis l'escalade de l'Est et l'Ouest comme cela s'est produit pour l'armement nucléaire (Smith, 1984).

Une autre crainte provient de la possibilité de produire des bactéries trop performantes. Si l'on considère les bactéries capables de digérer la lignine, celles-ci pourraient peut-être s'attaquer aux arbres vivants et détruire une partie de la biomasse (Miller, 1984).

La lixiviation biologique du minerai entraîne l'acidification du milieu du fait de la production d'acide sulfurique par les bactéries en cause. Les craintes proviennent ici de la possibilité d'acidification des réserves d'eau douce (Miller, 1984).

Maintenant que les possibilités de recombinaison génétique ont permis de franchir la barrière qui existait entre les espèces - un gène humain pouvant par exemple être intégré dans l'ADN d'une souris - on craint la création de véritables monstres, d'espèces animales atteintes de gigantisme ou d'autres formes de déséquilibre.

Ces progrès du génie génétique suscitent de vives inquiétudes quant à l'avenir de l'homme. La possibilité de créer des êtres humains reprogrammés dociles et productifs en effraie plus d'un, même si les connaissances actuelles ne permettent que de modifier quelques gènes chez certaines bactéries et que les expériences chez les animaux sont loin d'être probantes.

En général, les craintes suscitées par le développement des biotechnologies sont fondées sur des arguments relevant plus de l'hypothèse que de la réalité. Ces craintes ne pourront être dissipées que par:

1. Une évaluation critique des risques qui s'appuie sur des données expérimentales, pour le moment insuffisantes ou inexistantes. À ce sujet, nous croyons qu'il faudrait accorder priorité à l'élaboration d'une méthodologie de l'évaluation des risques. Il faudrait également concevoir de nouvelles techniques visant à diminuer les risques pour le personnel des bio-industries et pour l'environnement. Il devient nécessaire d'étudier la sécurité d'un procédé biologique, non seulement au stade de l'application industrielle, mais aussi aux étapes de la conception et du développement du procédé en question. La recherche devrait porter sur les besoins de l'industrie et plus particulièrement sur les aspects de la sécurité qui seraient négligés par l'industrie.

2. La diffusion de l'information ayant trait aux techniques biologiques de pointe. Il importe de bien renseigner les scientifiques, les autorités compétentes et le public afin que ceux-ci adoptent une attitude rationnelle et constructive face aux applications des nouvelles découvertes scientifiques relatives à la biotechnologie.

CONCLUSION

La sécurité des biotechnologies dépend essentiellement de la connaissance des risques reliés à ces nouvelles techniques.

En milieu de travail, les risques proviennent surtout de la possibilité de fuites de microorganismes hors des appareils de confinement et de l'exposition aux produits et aux sous-produits obtenus par les fermentations et les cultures cellulaires. Les risques sont entre autres la possibilité d'infection, d'intoxication, de sensibilisation et de transmission de propriétés microbiennes néfastes à l'homme. Les solutions: l'amélioration des méthodes de confinement physique et biologique, de surveillance médicale du personnel des bio-industries, l'observation rigoureuse des techniques aseptiques et la recherche de méthodes d'évaluation des risques et de méthodes de détection des fuites de microorganismes.

Pour ce qui est de l'environnement, les risques proviennent surtout de la possibilité d'infection et d'intoxication des êtres vivants des niches écologiques où sont libérés intentionnellement des microorganismes, de la transmission de propriétés microbiennes à la microflore de ces niches écologiques, de la production de substances toxiques, de la modification des conditions physico-chimiques du milieu et conséquemment de déséquilibre au sein d'un écosystème donné. Les solutions: concevoir des méthodes d'évaluation des risques et procéder à des études-pilotes avant la libération massive de microorganismes dans l'environnement.

À l'heure actuelle, le développement de techniques de détection des fuites de microorganismes, de méthodes et de programmes de détection

des effets néfastes des biotechnologies pour les individus exposés aux risques déjà mentionnés devrait constituer une priorité de recherche dans le domaine de la sécurité des biotechnologies.

Il semble souhaitable que les biotechnologies soient assujetties à des directives plutôt qu'à des règlements de sorte que ces directives puissent être modifiées plus facilement suivant l'acquisition des connaissances en matière de risque. Actuellement, les directives portent surtout sur les expériences de génie génétique et sur la manipulation de microorganismes en laboratoire; cependant, les organismes responsables de la sécurité des biotechnologies commencent à travailler à l'adaptation de ces règles de sécurité aux procédés industriels.

Quant aux craintes d'ordre socio-politique, celles-ci résultent non seulement de risques réels, mais aussi d'un manque d'information et de données expérimentales sur ces risques. Les craintes suscitées par les biotechnologies pourront être dissipées dans la mesure où ces lacunes seront comblées.

Enfin, au terme de cette étude, nous désirons formuler certains voeux quant aux domaines d'activité de l'Institut de biotechnologie.

1. Nous croyons que l'Institut devrait inclure l'étude des diverses facettes de la sécurité des biotechnologies parmi ses principaux objectifs.

2. La politique de l'Institut au sujet de la sécurité des biotechnologies devrait être axée principalement sur la recherche et le développement, ainsi que sur l'information.

Dans le premier cas, il s'agirait d'acquérir des connaissances par des travaux de recherche effectués principalement à l'extérieur (à contrat, par commandite ponctuelle ou par entente à plus longue échéance avec une équipe associée).

Dans le second cas, il s'agirait de constituer à l'intérieur même de l'Institut un centre de référence et de conseil en sécurité des biotechnologies, afin de diffuser une information adaptée aux besoins des premiers intéressés, c'est-à-dire l'industrie, les organismes de recherche et les ministères concernés.

A N N E X E

General Question Proposed for Research on Biotic Environmental Effects of Deliberately-Released Genetically-Engineered Microorganisms (GEMs). Questions are Delineated According to Series of Events Leading to Harm

EVENT	QUESTIONS
1. Incorporation of gene for hazardous trait into microorganisms	a. Can the "new" part of the genome be thoroughly characterized to assure that genes for undesirable traits are not intentionally or unintentionally included? How?
	b. To what extent can the GEMs, their products, and their intended uses be characterized before release?
	c. Will any GEMs (other than those intended for use as pesticides) carry genes (either "new" or part of original remaining genome) for traits hazardous to natural plants, animals, microbes or biological processes?
	d. Based on the knowledge and extent of genetic-engineering techniques used, is it possible to delineate different sets of GEMs which differ in likelihood of harm? How?
2. Survival in the environment.	a. Can the GEMs be specifically identified and detected in nature? How?
	b. Can the population size be determined at sufficiently low levels? How?
	c. Do the organisms survive in the environment in which they are placed or to which they are transported?
	d. Are the means of transport significant in initiating new populations in similar or different environments?
	e. Can the organisms be engineered to survive only in particular environments? How?
	f. What are the natural levels of the non-engineered parent organisms?

EVENT	QUESTION
	g. Do the GEMs have a selective survival advantage over the unaltered members of the species?
	h. Are the GEMs as stable genetically as the unaltered members of the species?
3. Multiplication in the environment	a. What is the quantitative population change over time in the environment in which the organisms are placed or to which they are transported?
	b. What environmental conditions affect multiplication and persistence? How?
	c. In these environments do the GEMs have a selective advantage over the unaltered members of the species?
	d. Can important environmental growth requirements be exploited to control or contain the microorganisms? How?
	e. Can the GEMs be engineered to multiply only in particular environments? How?
4. Contact with species or biological systems that the microorganisms can injure	a. What species or biological systems are exposed to the microorganisms?
	b. Is knowledge of the exposures associated with the unaltered parent organisms sufficient to predict the exposures of the engineered organisms?
	c. Do the intented pattern of use and knowledge of means of transport predict the species or systems to be exposed?
	d. What are the magnitude, frequency, duration and routes of exposure?
	e. Are existing exposure assessment methodologies for microorganisms satisfactory for GEMs?
	f. Can engineered genes or other genes be transferred in nature to other organisms? Which ones?
	g. Can genes from other organisms be transferred to GEMs more readily than to naturally-occuring ones? Why?
5. Causing harm	a. Do hazards exist with GEMs which would not be revealed with existing methodologies for identification of hazards associated with naturally-occuring microorganisms?

EVENT	QUESTION
	b. Can GEMs be subjected to a sufficient diversity of environments such that all "new" genes will be expressed?
	c. Is knowledge of the hazards associated with the unaltered parent organisms sufficient to predict the hazards associated with engineered organisms?
	d. Do GEMs have unique dose-response relationships or thresholds of activity that cannot be predicted from knowledge of unaltered parent organisms?
	e. What level of characterization of gene segments is sufficient to predict associated adverse effects? (i.e. is it possible to develop gene segment-activity relationships?)
	f. Can guidelines be developped for testing for adverse effects?

LISTE DES SOURCES CONSULTÉES

1. ALEXANDER, Martin (1980). "Helpful and Fallible Microorganisms: Importance in Transformation of Chemical Polluants", Microbiology, Washington, D.C., American Society for Microbiology, D. Schlessinger éd., pp. 328 à 332.

2. ATLAS, Ronald S. (1980). "Some Considerations on the Microbial Transformations of Organic Polluants: Microorganisms, Degradation, and Toxicity of Complex Mixtures", Microbiology, Washington, D.C., D. Schlessinger éd., pp. 339 à 340.

3. BRIERLY, Corale, L. (1982). "Microbiological Mining", Scientific American, 247 (2), pp. 44 à 53.

4. BRILL, Winston J. (1981). "Agricultural Microbiology", Scientific American, 245 (3), pp. 198 à 215.

5. C.R.M. - Conseil de recherches médicales du Canada (1980). "Directives concernant la manipulation de molécules d'ADN produites par recombinaison et des cellules et virus animaux".

6. HOLMBERG, Scott D. (1984). "Drug Resistant Salmonella from Animals Fed Antimicrobials", The New England Journal of Medicine, 311 (10), pp. 617 à 622.

7. KRIMSKY, Sheldon. Regulatory Policies on Biotechnology in Canada. A manuscript report prepared for the Science Council of Canada, Octobre 1984.

8. LANDRIGAN, Philip J. et al. (1982). "Medical Surveillance of Biotechnology Workers. Report of the C.D.C. N.I.O.S.H. ad hoc Working Group on Medical Surveillance for Industrial Applications of Biotechnology", Recombinant DNA Technical Bulletin 5 (3) pp. 133 à 138.

9. MARO - MAZUE, G. et R. RONCUCCI. "Réflexions sur les études toxicologiques des médicaments issus des biotechnologies", Biofutur, mai 1983, pp. 33 à 35.

10. MILLER, Judith. "Harmful Environmental Effects of Biotechnology Conséquences of Deliberate Release", paper prepared for "Regulation of Biotechnology", a conference sponsored by the Canadian Environmental Law Research Foundation, Toronto, Ontario, October 9, 1984.

11. N.I.H. - National Institute of Health, DHHS (1983). "Guidelines for Research Involving Recombinant DNA Molecules". Federal Register, 48 (106), pp. 24 556 à 24 581.

12. NEWMAN, Stuart A. "Toxicology of Biotechnological Products": Environmental Considerations", 15e colloque annuel de la Société de toxicologie du Canada, "Challenges in Pharmaceutical Technology", Montréal, 30 novembre 1982.

13. PHAFF, Norman J. (1981). Industrial Microorganism", Scientific American, 245 (3), pp. 76 à 89.

14. RECD "Meeting of the Large-Scale Review Working Group of the Recombinant DNA Advisory Committee" (1983). Recombinant DNA Technical Bulletin, 6 (1), pp. 19 à 24.

15. RIFKIN, Jeremy. Conférencier invité lors du colloque organisé par la Canadian Environment Law Research Foundation". The Regulation of Biotechnology, Toronto, 9 octobre 1984.

16. RISSLER, Jane F. (1984). "Research Needs for Biotic Environmental Effects of Genetically-Engineered Microorganisms", Recombinant DNA Technical Bulletin, 7, pp. 20 à 30.

17. RUSSEL, Derek. "Safety Considerations in Biotechnical Processing", Process Engineering, août 1983, pp. 18 à 21.

17. S.S.T. - Secrétariat à la science et à la technologie. Gouvernement du Québec. "À l'heure des biotechnologies. La biosécurité". Rapport de la mission ad hoc sur la biosécurité, 1982.

18. SMITH, Jeffrey R. (1984). "The Dark Side of Biotechnology", Science, 224 (4 654), pp. 1 215 à 1 216.